

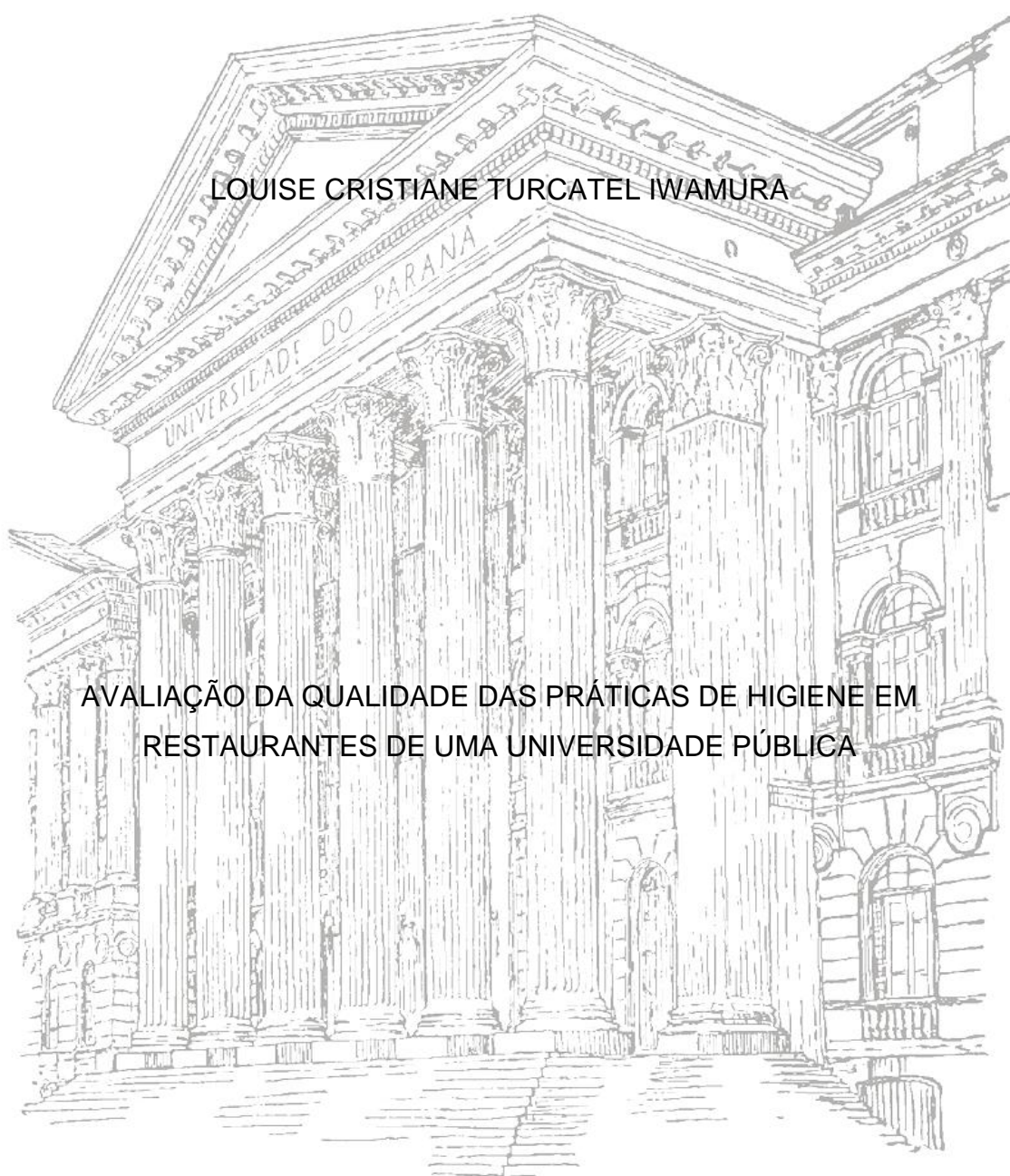
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LOUISE CRISTIANE TURCATEL IWAMURA

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DAS PRÁTICAS DE HIGIENE EM  
RESTAURANTES DE UMA UNIVERSIDADE PÚBLICA

CURITIBA

2014



LOUISE CRISTIANE TURCATEL IWAMURA

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DAS PRÁTICAS DE HIGIENE EM RESTAURANTES DE  
UMA UNIVERSIDADE PÚBLICA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Segurança Alimentar e Nutricional, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Carneiro Hecke Krüger

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Regina Beux

CURITIBA

2014

Iwamura, Louise Cristiane Turcatel  
Avaliação da qualidade de higiene em restaurantes de uma universidade pública / Louise Cristiane Turcatel Iwamura.– Curitiba, 2014.  
108 f.; il. (algumas color.); 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Cláudia Carneiro Hecke Krüger  
Coorientadora: Professora Dra. Márcia Regina Beux  
Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Segurança Alimentar e Nutricional, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2014.

Inclui bibliografia

1. Qualidade microbiológica. 2. Superfície de contato com alimentos.  
3. Manipuladores de alimentos. 4. Qualidade da água. I. Krüger, Cláudia  
Carneiro Hecke. II. Beux, Márcia Regina. III. Universidade Federal do Paraná.  
IV. Título.

CDD 664.028

## TERMO DE APROVAÇÃO

**LOUISE CRISTIANE TURCATEL IWAMURA**

**Título: "AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DAS PRÁTICAS DE HIGIENE EM RESTAURANTES DE UMA UNIVERSIDADE PÚBLICA"**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Segurança Alimentar e Nutricional, da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof. Dra. Cláudia Carneiro Hecke Kruger  
Orientadora



Prof. Dra. Wanda Moscalewski Abrahão  
Universidade Federal do Paraná



Prof. Dra. Thalyta Marina Benetti  
Faculdade Educacional de Araucária

Curitiba, 21 de julho de 2014.

*Dedico este trabalho aos meus pais, em especial minha mãe, Henrieta e Mauro, aos meus irmãos Mauren e Helison (in memoriam) e ao meu marido Leonardo.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus e espíritos orientadores.

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-graduação em Segurança Alimentar e Nutricional, pela oportunidade de realizar o mestrado.

À minha família, especialmente minha mãe, Henrieta, pelo amor, carinho, incentivo, apoio e confiança.

Ao meu marido Leonardo, pelo amor, paciência e compreensão pelas horas de ausência.

À Professora Doutora Cláudia Carneiro Hecke Krüger, pela orientação, apoio e estímulo.

À Professora Doutora Márcia Regina Beux, pela dedicada orientação, paciência, apoio, estímulo e pelas longas conversas e cafés.

À Elisa Hizuru Uemura Yamanaka e ao Laboratório Laborclin pelo apoio e incentivo oferecidos e ajuda com os materiais.

À administração e nutricionistas dos Restaurantes Universitários, pela colaboração para realização da coleta de dados e incentivo à pesquisa e aos manipuladores de alimentos dos restaurantes universitários pela colaboração e disposição em participar da coleta de dados.

Aos técnicos do laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia Básica da UFPR, Jason Lee Furuie, Fábio Gaio Chimentão e Isabel Joana de Lima pela ajuda no preparo e descarte do material.

Aos professores, professores aposentados e técnicos do Departamento de Nutrição da UFPR e do Programa de Pós-graduação em Segurança Alimentar e Nutricional da UFPR pelo apoio.

Ao Laboratório de Estatística da UFPR pelo auxílio com as análises.

A todas as minhas colegas de mestrado pelo apoio, companhia e momentos de alegria e festas – gratidão por serem pessoas tão especiais.

À Fernanda Tolentino pela ajuda na coleta de dados.

À secretaria do Programa de Pós-graduação em SAN, Andressa G. Almeida.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização desse mestrado.

## RESUMO

Alimento seguro é aquele que não causará dano ao consumidor quando consumido. Desta forma, o monitoramento das Boas Práticas de Higiene é fundamental para garantir a qualidade sanitária e segurança dos alimentos servidos à população e evitar doenças causadas por micro-organismos patogênicos de origem alimentar. O objetivo desse estudo foi avaliar a qualidade das práticas de higiene de três restaurantes de uma universidade pública através do monitoramento microbiológico pelo método de contato com “swab”, conforme recomendado pela *American Public Health Association* (APHA), de superfícies previamente higienizadas (n =24) da área de processamento de frutas e vegetais para contagem total de bactérias, coliformes totais e *Escherichia coli*, *Staphylococcus* sp, *Enterococcus* sp e *Pseudomonas aeruginosa*, mãos dos manipuladores de alimentos após lavagem e desinfecção (n = 81) pelo método de decalque em laminocultivos para contagem total de bactérias, coliformes totais e *E. coli* e *Staphylococcus* sp, água filtrada (n = 3) e água de torneira (n=3) pelos métodos presença/ausência com substrato cromogênico para Coliformes totais e *Escherichia coli* e semeadura em superfície adaptado para o laminocultivo com *Plate Count Agar* (PCA) para contagem de bactérias heterotróficas a 37°C, conforme recomendado pelo *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* – APHA (2012). As superfícies de contato com alimentos apresentaram resultados insatisfatórios em 12,5% (n=3) para coliformes totais, 8,3% (n=2) para *Staphylococcus* sp e 54,2% (n=13) para contagem total de bactérias. Todos os resultados foram satisfatórios para *Enterococcus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Nenhum manipulador apresentou resultados insatisfatórios para contagem total de bactérias e para coliformes totais. Apenas 5% dos manipuladores (n=4) apresentaram resultados insatisfatórios para *Staphylococcus* sp, destes, em um manipulador foi confirmada a presença de *Staphylococcus* coagulase positivo. As análises da água indicaram resultados satisfatórios para todas as amostras. Como conclusão, os resultados indicam procedimento de limpeza e desinfecção não padronizados nas superfícies de contato com alimentos dos restaurantes universitários. O procedimento de lavagem e antisepsia das mãos dos manipuladores foi eficiente. Há um tratamento adequado da água, um sistema de distribuição sem falhas e uma limpeza e desinfecção eficaz dos reservatórios de água.

**Palavras-chave:** Qualidade microbiológica. Superfície de contato com alimentos. Manipuladores de alimentos. Qualidade da água.

## ABSTRACT

A safe food is one that will not cause any harm to the consumer after consumption. Therefore, monitoring Good Hygienic Practices is essential to ensure the sanitary quality and safety of the food served to population and to prevent diseases caused by foodborne pathogenic microorganisms. The purpose of this study was to evaluate the quality of hygiene practices in three public university restaurants by monitoring the microbiological quality using the swab contact method, as recommended by the *American Public Health Association* (APHA), of previously sanitized surfaces (n=24) of fruit and vegetable processing area for total bacterial count, total coliforms and *Escherichia coli*, *Staphylococcus* sp, *Enterococcus* sp and *Pseudomonas aeruginosa*, hands of food handlers after washing and disinfection (n= 81) by imprint method with contact-slides for total bacterial count, total coliforms and *Escherichia coli* and *Staphylococcus* sp, filtered (n=3) and tap water (n=3) by presence-absence method with fluorogenic substrate for total coliforms and *Escherichia coli*, and spread plate method adapted to contact-slides with *Plate Count Agar* (PCA) for heterotrophic plate count at 37°C, as recommended by the *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* – APHA (2012). The food contact surfaces showed unacceptable results in 12,5% (n=3) for total coliforms, 8,3% (n=2) for *Staphylococcus* sp and 54,2% (n=13) for total bacterial count. There were no unsatisfactory results for *Enterococcus* and *Pseudomonas aeruginosa*. There were no unsatisfactory results for total bacterial count and total coliforms on hands of food handlers. Only 5% of food handlers (n=4) showed unsatisfactory results for *Staphylococcus* sp, of which only one confirmed the presence of coagulase positive. The analysis of water showed satisfactory results for all samples. In conclusion, the results indicate a non-regular cleaning procedure in food contact surfaces of university restaurants. The washing and antisepsis procedure of food handlers was efficient. There is an adequate water treatment, a distribution system without flaws, as well as an effective cleansing and disinfection of water reservoirs.

**Keywords:** Microbiological quality. Food contact surfaces. Food handlers. Water quality.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

GRÁFICO 1 -	CONTAGEM DE COLIFORMES TOTAIS DAS SUPERFÍCIES DOS RESTAURANTES UNIVERSITÁRIOS, CUJOS RESULTADOS SE APRESENTARAM INSATISFATÓRIOS AOS LIMITES ESPECIFICADOS PELA APHA (2001).....	78
GRÁFICO 2 -	CONTAGEM DE <i>Staphylococcus</i> sp DAS SUPERFÍCIES DOS RESTAURANTES UNIVERSITÁRIOS, CUJOS RESULTADOS SE APRESENTARAM INSATISFATÓRIOS AOS LIMITES ESPECIFICADOS PELA APHA (2001).....	80
GRÁFICO 3 -	SUPERFÍCIES DOS RESTAURANTES UNIVERSITÁRIOS QUE APRESENTARAM CONTAGEM DE <i>Enterococcus</i> sp.....	81
GRÁFICO 4 -	CONTAGEM TOTAL DE BACTÉRIAS DAS SUPERFÍCIES DOS RESTAURANTES UNIVERSITÁRIOS, CUJOS RESULTADOS SE APRESENTARAM INSATISFATÓRIOS AOS LIMITES ESPECIFICADOS PELA APHA (2001).....	82
GRÁFICO 5 -	BOXPLOT DA MÉDIA DOS VALORES DA CONTAGEM TOTAL DE BACTÉRIAS DOS MANIPULADORES DE ALIMENTOS NOS RESTAURANTES AVALIADOS.....	85
GRÁFICO 6 -	FREQUÊNCIA DE INADEQUAÇÃO EM RELAÇÃO ÀS ESPECIFICAÇÕES DE SILVA JR. (2005) PARA COLIFORMES TERMOTOLERANTES DAS MÃOS HIGIENIZADAS DOS MANIPULADORES DE ALIMENTOS DOS RESTAURANTES “A” E “C”.....	86
GRÁFICO 7 -	BOXPLOT DAS MÉDIAS DAS CONTAGENS DE <i>Staphylococcus</i> sp DOS MANIPULADORES DE ALIMENTOS NOS RESTAURANTES AVALIADOS.....	89

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	AGENTES ETIOLÓGICOS IDENTIFICADOS POR SURTO NO BRASIL ENTRE OS ANOS 2000 E 2011.....	48
FIGURA 2 -	COLETA DAS AMOSTRAS COM SWAB E DELIMITADOR DE 100CM² EM SUPERFÍCIE DE CONTATO COM ALIMENTOS.....	59
FIGURA 3 -	FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DO MÉTODO DE PLAQUEAMENTO EM SUPERFÍCIE.....	60
FIGURA 4 -	FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DE IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DAS COLÔNIAS DO MEIO E CULTURA ECC CROMOGÊNICO.....	62
FIGURA 5 -	FLUXOGRAMA DA COLETA DAS AMOSTRAS EM MÃOS DE MANIPULADORES DE ALIMENTOS DOS RESTAURANTES UNIVERSITÁRIOS.....	66
FIGURA 6 -	ESQUEMA UTILIZADO PARA COLETA DAS AMOSTRAS DE MÃOS DE MANIPULADORES.....	67
FIGURA 7 -	COLETA DAS AMOSTRAS DAS MÃOS DE MANIPULADORES PELO MÉTODO DO DECALQUE COM LAMINOCULTIVOS.....	68
FIGURA 8 -	FORMAÇÃO DO COÁGULO FIRME (TUBO “C”) PELO TESTE DE COAGULASE EM TUBO COM PLASMA DE COELHO LIOFILIZADO COM EDTA.....	70
FIGURA 9 -	FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DE IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA <i>Staphylococcus</i> sp.....	71
FIGURA 10 -	PROCEDIMENTO PARA ANÁLISE DE COLIFORMES TOTAIS E <i>Escherichia coli</i> PELO MÉTODO DO SUBSTRATO CROMOGÊNICO.....	74
FIGURA 11 -	ANÁLISE DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS A 37°C PELO MÉTODO DE SEMEADURA EM SUPERFÍCIE ADAPTADO AO LAMINOCULTIVO AQUACULT® - LABORCLIN®.....	74
FIGURA 12 -	PROCEDIMENTO PARA CONTAGEM DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS A 37°C PELO MÉTODO DE SEMEADURA EM SUPERFÍCIE ADAPTADO PARA LAMINOCULTIVOS.....	75
FIGURA 13 -	GABARITO DE LEITURA AQUACULT® (LABORCLIN®).....	76

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	PORCENTAGEM DAS SUPERFÍCIES DE CONTATO COM ALIMENTOS COM RESULTADOS INSATISFATÓRIOS AOS LIMITES ESPECIFICADOS PELA APHA (2001).....	77
TABELA 2 –	FREQUÊNCIA DE INADEQUAÇÕES NA LAVAGEM E ANTISSEPSE DAS MÃOS DOS MANIPULADORES EM RELAÇÃO ÀS ESPECIFICAÇÕES DE MARZANO E BALZARETTI (2011).....	84
TABELA 3 –	RESULTADOS DAS ANÁLISES DE ÁGUA FILTRADA E ÁGUA DE TORNEIRA COLETADAS NOS RESTAURANTES UNIVERSITÁRIOS.....	90

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 -	SUPERFÍCIES DE CONTATO COM ALIMENTOS ANALISADAS NOS RESTAURANTES UNIVERSITÁRIOS.....	59
QUADRO 2 -	MICRO-ORGANISMOS ANALISADOS E MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA HIGIENIZAÇÃO DAS SUPERFÍCIES DE CONTATO COM ALIMENTOS.....	60
QUADRO 3 -	ESPECIFICAÇÕES MICROBIOLÓGICAS RECOMENDADAS PELA APHA (2001) PARA SUPERFÍCIES DE CONTATO COM ALIMENTOS.....	61
QUADRO 4 -	MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS PARA AVALIAÇÃO DAS MÃOS DOS MANIPULADORES.....	65
QUADRO 5 -	ESPECIFICAÇÕES MICROBIOLÓGICAS APRESENTADAS POR MARZANO E BALZARETTI (2011).....	68
QUADRO 6 -	CATEGORIZAÇÃO DOS RESULTADOS DAS AMOSTRAS DAS MÃOS DOS MANIPULADORES DE ALIMENTOS.....	72
QUADRO 7 -	PADRÕES MICROBIOLÓGICOS PARA ÁGUA POTÁVEL ESTABELECIDOS PELA PORTARIA Nº 2.914 DE 12 DE DEZEMBRO DE 2011 DO MINISTÉRIO DA SAÚDE.....	76
QUADRO 8 -	MÉDIA DAS TRIPLICATAS DAS AMOSTRAS DAS MÃOS DOS MANIPULADORES AVALIADOS.....	88

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>APHA</b>	<i>American Public Health Association</i>
<b>APPCC</b>	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
<b>BHI</b>	<i>Brain Heart Infusion</i>
<b>BP</b>	Boas Práticas
<b>BPM</b>	Boas Práticas de Manipulação
<b>CCAB</b>	Comitê do <i>Codex Alimentarius</i> do Brasil
<b>CDC</b>	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
<b>CEM</b>	Centro de Estudos do Mar
<b>CEU</b>	Casa do Estudante Universitário
<b>DCE</b>	Diretório Central dos Estudantes
<b>DTA</b>	Doenças Transmitidas por Alimentos
<b>HPC</b>	Contagem de Bactérias Heterotróficas
<b>ICMSF</b>	<i>International Commission on Microbiological Specifications for Foods</i>
<b>MSA</b>	Ágar manitol sal
<b>NMP</b>	Número Mais Provável
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>ONU</b>	Organização das Nações Unidas
<b>PAA</b>	Programa de Aquisição de Alimentos
<b>PCA</b>	Ágar Padrão de Contagem
<b>PIQ</b>	Padrão de Identidade e Qualidade
<b>POP</b>	Procedimentos Operacionais Padronizados
<b>PPHO</b>	Procedimentos Padrão de Higiene Operacional
<b>PRA</b>	Pró-Reitoria de Administração
<b>PRAC</b>	Pró-reitoria de Assuntos Comunitários
<b>RDC</b>	Resolução da Diretoria Colegiada
<b>REUNI</b>	Reestruturação e Expansão das Universidades Federais
<b>RODAC</b>	Replicação de Organismos Diretamente em Ágar após Contato
<b>RU</b>	Restaurantes Universitários
<b>SAN</b>	Segurança Alimentar e Nutricional

<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colônias
<b>UFPR</b>	Universidade Federal do Paraná
<b>VRBA</b>	Ágar violeta vermelho bile
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i>

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
1.1	OBJETIVO.....	20
1.1.1	Objetivos específicos.....	20
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>21</b>
2.1	HISTÓRIA DOS RESTAURANTES UNIVERSITÁRIOS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ.....	21
2.2	BOAS PRÁTICAS EM SERVIÇOS DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO.....	26
2.3	HIGIENIZAÇÃO DE SUPERFÍCIES DE CONTATO COM ALIMENTOS.....	30
2.3.1	Limpeza e desinfecção.....	31
2.3.2	Formação de biofilmes.....	32
2.3.3	Controle e monitoramento do processo de limpeza e desinfecção...	34
2.3.3.1	Micro-organismos indicadores de condições sanitárias.....	35
2.3.3.1.1	Contagem total de bactérias.....	36
2.3.3.1.2	Coliformes totais e Coliformes termotolerantes.....	36
2.3.3.1.3	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	38
2.3.3.2	<i>Enterococcus</i> .....	39
2.3.3.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	40
2.4	LAVAGEM E ANTISSEPSE DAS MÃOS DE MANIPULADORES DE ALIMENTOS.....	41
2.4.1	<i>Staphylococcus aureus</i> e manipuladores de alimentos.....	45
2.5	MÉTODOS UTILIZADOS PARA ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE SUPERFÍCIES DE CONTATO COM ALIMENTOS E MANIPULADORES.....	49
2.5.1	Swab ou Método cotonete.....	50
2.5.2	Método da placa de contato (RODAC e laminocultivos).....	50
2.6	POTABILIDADE DA ÁGUA FILTRADA E ÁGUA DE TORNEIRA.....	51
2.6.1	Coliformes totais e <i>Escherichia coli</i> .....	53
2.6.2	Contagem de Bactérias Heterotróficas.....	55
<b>3.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>58</b>

3.1	SUPERFÍCIE DE CONTATO COM ALIMENTOS.....	58
3.1.1	Coleta das amostras.....	58
3.1.2	Método convencional para análise de superfícies de contato com alimentos.....	58
3.1.3	Plaqueamento seletivo diferencial.....	60
3.1.4	Enumeração das colônias.....	61
3.1.5	Confirmação das colônias típicas e identificação bioquímica.....	61
3.1.5.1	Ágar ECC cromogênico.....	61
3.1.5.2	Ágar Azida com sangue.....	62
3.1.5.3	Ágar Sal Manitol.....	63
3.1.5.4	Ágar Cetrimide.....	63
3.1.6	Análise estatística.....	63
3.2	MANIPULADORES DE ALIMENTOS.....	64
3.2.1	Coleta das amostras.....	64
3.2.2	Método utilizado para coleta das amostras.....	64
3.2.3	Especificações microbiológicas utilizadas para avaliação dos resultados.....	67
3.2.4	Confirmação das colônias típicas e identificação bioquímica - Bacilos Gram-negativos.....	68
3.2.5	Confirmação das colônias típicas e identificação bioquímica - <i>Staphylococcus</i> sp.....	69
3.2.6	Análise estatística.....	72
3.3	ÁGUA FILTRADA E ÁGUA DE TORNEIRA.....	72
3.3.1	Pesquisa de Coliformes totais e <i>Escherichia coli</i> .....	73
3.3.2	Contagem de Bactérias Heterotróficas a 37°C.....	74
3.3.3	Análise estatística.....	76
4.	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>77</b>
4.1	SUPERFÍCIE DE CONTATO COM ALIMENTOS.....	77
4.1.1	Coliformes totais.....	77
4.1.2	<i>Staphylococcus</i> sp.....	79
4.1.3	<i>Enterococcus</i> sp e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	81
4.1.4	Contagem Total de Bactérias.....	82
4.2	MANIPULADORES DE ALIMENTOS.....	84



4.2.1	Contagem Total de Bactérias.....	84
4.2.2	Coliformes Totais.....	85
4.2.3	<i>Staphylococcus</i> sp.....	87
4.3	ÁGUA FILTRADA E ÁGUA DE TORNEIRA.....	90
5.	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>92</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>94</b>
	<b>APÊNDICE.....</b>	<b>108</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A formulação e a execução de programas e políticas públicas voltadas para Segurança Alimentar e Nutricional (SAN) ganharam magnitude nas últimas décadas no Brasil e no mundo (SANTOS E SANTOS, 2007). Estas políticas conduzem a ações de diversos setores - saúde, educação, agricultura e trabalho – os quais devem atuar de forma integrada visando garantir a disponibilidade, o acesso físico e econômico e o aproveitamento biológico do alimento.

Segundo Burity *et al.* (2010), a segurança alimentar e nutricional é um dever do Estado. Desta forma é obrigação do Estado proteger, respeitar, promover e prover alimentação adequada, de forma permanente, com adequação nutricional e qualidade sanitária, respeitando a diversidade e a cultura alimentar regional, promovendo o acesso à informação e oferecendo alimentos livres de contaminantes e agrotóxicos.

Nesse sentido, o acesso aos caminhos que garantam a alimentação dos estudantes universitários, como os restaurantes universitários, é fundamental para colaborar com a construção de políticas públicas que assegurem o abastecimento alimentar a preços acessíveis, com qualidade nutricional e sanitária, englobando o respeito à diversidade e à cultura local. Assim, as universidades públicas, como representação do Estado, devem assegurar aos estudantes universitários uma alimentação com os atributos já referenciados.

Uma peculiaridade do conceito de SAN é englobar numa única definição duas dimensões inseparáveis, que são a disponibilidade de alimentos (*food security* – segurança alimentar) e a qualidade dos alimentos em termos da inocuidade do seu consumo (*food safety* – segurança dos alimentos) (LEÃO E MALUF, 2012).

Segundo *World Health Organization* (WHO) (2003), alimento seguro é definido como aquele produto que não causará dano ao consumidor quando preparado ou consumido de acordo com seu uso. Assim, um controle de higiene efetivo é vital para evitar prejuízos à saúde da população e consequências econômicas resultantes do tratamento de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA). Doenças causadas por micro-organismos patógenos de origem alimentar constituem um problema de saúde pública mundial (ICMSF, 2006) e é necessário planejar estratégias apropriadas para controlar e prevenir esse potencial risco à saúde (CUNHA *et al.*, 2014).

Em tal contexto, com o objetivo de melhorar o sistema nacional de controle de alimentos e aumentar a segurança dos consumidores, o Comitê do *Codex Alimentarius* do Brasil (CCAB) é favorável à incorporação de um padrão de análise de risco nas práticas institucionais (CUNHA *et al.*, 2014). Assim, as autoridades sanitárias estabeleceram ferramentas e sistemas a serem seguidos pelos serviços de alimentação e pela indústria de alimentos, como as Boas Práticas (BP), Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO), sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), Procedimentos Operacionais Padronizados (POP) e ainda as Normas ISO 9001 e 22000, estabelecidos para garantir a segurança dos alimentos e reduzir os casos de DTA (LOPES, 2004; TONDO E BARTZ, 2012; BALZARETTI E MARZANO, 2013).

A segurança alimentar é um componente fundamental para aceitação de um alimento pelo consumidor e a população está cada vez mais preocupada com a qualidade sanitária do alimento. Assim, é papel dos serviços de alimentação e nutrição manter a confiança deste cliente colocando em prática as ferramentas que garantam esta qualidade sanitária (KO, 2010). Desta forma, aspectos vinculados à qualidade sanitária dos alimentos servidos nos restaurantes universitários possuem particular relevância.

De acordo com levantamento realizado por Cunha *et al.* (2014) os principais fatores que podem causar surtos de DTA no Brasil são, nesta ordem, aspectos relacionados a tempo e temperatura, contaminação por manipuladores de alimentos, equipamentos e utensílios, água e matéria-prima contaminadas e contaminações indiretas. A contaminação cruzada via superfícies de contato com alimentos é um importante fator para a ocorrência de DTA. Os micro-organismos podem se difundir facilmente de superfícies ou alimentos contaminados para utensílios ou outros alimentos. Algumas bactérias são capazes de se fixar nas superfícies como biofilmes, que permitem que aquelas persistam mesmo em condições adversas, pois são menos sensíveis às operações de limpeza e desinfecção (DOMÉNECH-SÁNCHEZ *et al.*, 2011).

O manipulador de alimentos requer maior controle para garantir a segurança dos alimentos (COELHO *et al.*, 2010). O treinamento, a boa higiene pessoal, a prática de lavagem e antissepsia das mãos eficaz e práticas de manipulação adequadas ao trabalho são essenciais. Mesmo com habilidade e conhecimento para manipular o alimento de forma segura, erros durante a manipulação são

responsáveis por muitos surtos de intoxicação alimentar devido a hábitos higiênicos inadequados (SOARES *et al.*, 2012).

A qualidade da água também está relacionada com o nível de contaminação microbiológica além de outros fatores. Segundo a Portaria nº 2914 de 12 de dezembro de 2011 do Ministério da Saúde, água para consumo humano é uma água potável destinada à ingestão, preparação e produção de alimentos e à higiene pessoal, independente de sua origem e que não ofereça riscos à saúde (BRASIL, 2011a). Sistemas de distribuição de água para consumo podem estar colonizados por bactérias heterotróficas que crescem em matéria orgânica e micro-organismos patogênicos, incluindo aqueles de origem fecal que encontram condições favoráveis para proliferar nestes sistemas (SILVA *et al.*, 2008).

Diante do exposto, compreende-se que a qualidade microbiológica dos alimentos e da água para consumo se insere no amplo conceito de Segurança Alimentar e Nutricional (ABRANDH, 2005) e é fundamental realizar o monitoramento das Boas Práticas de Higiene nos restaurantes universitários. O monitoramento periódico, como análise microbiológica de superfícies, equipamentos, mãos e água, deve ser executado para determinar a contaminação ambiental de forma a verificar a eficiência dos procedimentos de limpeza e sanitização, a periodicidade da troca de filtros dos bebedouros e a higiene dos reservatórios de água para, posteriormente, tomar medidas corretivas, caso seja necessário. Isto poderá colaborar para o fornecimento de alimentos seguros aos usuários dos restaurantes universitários.

## 1.1 OBJETIVO

Avaliar a qualidade microbiológica das práticas de higiene em restaurantes de uma universidade pública do Estado do Paraná.

### 1.1.1 Objetivos específicos

- Avaliar a qualidade microbiológica das superfícies de contato com os alimentos, previamente higienizadas, das áreas de processamento de frutas e vegetais;
- Avaliar a qualidade microbiológica da lavagem e antissepsia das mãos dos manipuladores de alimentos;
- Avaliar a potabilidade sob o aspecto microbiológico da água filtrada e da água de torneira utilizada para preparo dos alimentos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 RESTAURANTES UNIVERSITÁRIOS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Os restaurantes universitários (RU) da Universidade Federal do Paraná (UFPR) não deixaram nenhum memorial ou documento específico registrado da sua história desde sua criação, assim, parte do que se resgatou acerca do seu contexto histórico teve como fonte o depoimento de pessoas que trabalharam nestes estabelecimentos a partir de 1980, bem como de substratos extraídos de páginas disponibilizadas na internet da Pró-reitoria de Administração da UFPR.

De acordo com Wachowicz (2006) em seu livro “Universidade do Mate – História da UFPR”, com a redemocratização do país a partir de 1945, a história da organização estudantil, com a União Estadual de Estudantes Paranaenses, ingressou numa fase de grandes realizações e conquistas, entre elas o Restaurante Universitário e a Casa do Estudante Universitário. O restaurante universitário foi a primeira grande conquista dos estudantes de Curitiba, com intervenção do governador Moisés Lupion, no seu primeiro mandato (1947 a 1951). Sensibilizado com a situação dos estudantes, o Governador entregou a administração do antigo Restaurante do Passeio Público à União Paranaense dos Estudantes. O restaurante entrou em funcionamento em agosto de 1947, servindo refeições para 280 estudantes. Os próprios estudantes adquiriram as bandejas, copos, pratos e talheres. Um ano depois, foi instituída a Casa do Estudante Universitário de Curitiba (CEU), com 66 quartos e acomodação para 166 estudantes, restaurante com capacidade para 320 refeições diárias, lavanderia, barbearia, assistência médica e farmacêutica.

Segundo dados da Pró-Reitoria de Administração da Universidade Federal do Paraná (UFPR, 2013a), o restaurante localizado na Rua Amintas de Barros junto ao prédio da Reitoria (hoje Restaurante Universitário Central) teve origem em 1961, ainda administrado pelos estudantes, mais especificamente, por membros do Diretório Central dos Estudantes (DCE), que mantinham serviço terceirizado para produção das refeições e o valor do aluguel do local era revertido aos estudantes.

Não foram encontrados registros com datas exatas do início do funcionamento dos restaurantes do Centro Politécnico e Agrárias, somente que eles já existiam antes de 1980, também administrados e terceirizados pelos Diretórios Acadêmicos dos setores correspondentes. Na década de 70, os restaurantes foram fechados pela saúde municipal por más condições na estrutura física e de higiene no local de preparo e servimento das refeições.

Em estado precário e com equipamentos antigos, os restaurantes reabriram a partir de 1980, quando passaram a ser administrados pela UFPR, vinculados a Pró-reitoria de Assuntos Comunitários (PRAC), sendo denominados “Restaurantes Universitários” (UFPR, 2013a). Os estudantes não aceitavam a administração pela universidade e a reitoria precisou fazer um acordo onde afirmava direcionar recursos para a reforma dos restaurantes e para subsidiar uma alimentação variada e de qualidade. Houve contratação de pessoal para sua administração e de mão de obra para o preparo e servimento das refeições. Os cardápios, bem como a previsão de consumo dos gêneros, passaram a ser elaborados por uma nutricionista. Mesmo assim, a estrutura e os equipamentos ainda não eram suficientes para produção de refeições.

Com o compromisso da Reitoria, os restaurantes conseguiram servir um cardápio variado, composto por arroz, feijão, prato principal (carne), guarnição, salada, sobremesa e pão. Como bebidas serviam refrigerantes, leite e água, com uma única opção, escolhida pelos comensais. Uma pequena parte do frango, ovos e vegetais e, muitas vezes o feijão e o leite, eram fornecidos por uma das seis fazendas do Centro de Estações Experimentais da UFPR, a Fazenda Canguiri, com um valor abaixo do mercado, colaborando para a qualidade da alimentação servida, visto que a produção da fazenda era realizada sem o uso de agrotóxicos. Estes produtos foram fornecidos pela Fazenda ao RU até aproximadamente 2003, quando toda a compra para os restaurantes passou a ser realizada por meio de licitação.

Após 1982, a qualidade da refeição do RU decaiu devido à falta de verbas. O país passava por um momento de instabilidade econômica e não havia dinheiro para repasse da Reitoria aos restaurantes. Retiraram do cardápio o pão, peixe, leite e refrigerantes. As carnes servidas geralmente eram provenientes do dianteiro bovino e, houve meses, que só podiam comprar carne moída devido ao custo. Ainda na década de 1980, para incentivar os estudantes a se alimentarem no RU, o valor cobrado pelas refeições tinha como base o valor da passagem de ônibus, ou

seja, se o aluno gastava dois cruzeiros (no caso, a moeda utilizada na época) para ir até a sua casa almoçar e voltar, o valor da refeição seria inferior. Com isso, os estudantes permaneciam na Universidade e se alimentavam nos restaurantes. Ao final da década de 80, com a crise financeira e a inflação em alta, o preço da refeição precisava ser reajustado todos os meses e os estudantes faziam manifestações contra o aumento dos preços com frequência. Membros do Diretório Central dos Estudantes se reuniam com a diretoria dos restaurantes universitários para discutirem acordos em relação ao valor cobrado pela refeição.

Desde a abertura dos restaurantes, o sistema utilizado para a distribuição dos alimentos aos estudantes foi o servimento “porcionado”, onde os usuários eram servidos de porções pré-estabelecidas de alimentos. Em 1995, o RU Central adotou o sistema “*self-service*”, sendo porcionadas apenas a carne e a sobremesa, o que proporcionou maior conforto aos usuários em determinar as quantidades desejadas. Em 1999 a cozinha do RU Agrárias foi desativada e as refeições passaram a ser produzidas e transportadas pelo RU Central (UFPR, 2013a).

Atualmente, a administração dos restaurantes é realizada pela Pró-Reitoria de Administração (PRA). A Administração está localizada no RU Central, onde são feitas as licitações e compras. O recebimento dos produtos, controle geral de estoque e transporte de gêneros alimentícios é realizado no RU do Centro Politécnico. Neste local chegam os gêneros semiperecíveis e, diariamente, os perecíveis (carnes e hortifrutigranjeiros), onde são avaliados em relação à quantidade e qualidade solicitadas. A partir deste procedimento há a distribuição para os outros restaurantes, sendo transportados os gêneros semiperecíveis quinzenalmente e os perecíveis *in natura* e carnes pré-preparadas, diariamente (UFPR, 2013a).

Hoje a UFPR conta com quatro restaurantes universitários em Curitiba e com uma equipe de seis nutricionistas. O RU Central, junto à Reitoria serve em média 270 cafés da manhã, 1.550 almoços e 800 jantares; o RU Centro Politécnico, localizado no *campus* do Politécnico serve em média 370 cafés da manhã, 3.500 refeições no almoço e 1.100 refeições no jantar. O RU Botânico, inaugurado em 2012 no *campus* Jardim Botânico, fornece 1.150 almoços e 350 jantares e passou a servir café da manhã em junho de 2013. O RU Agrárias, localizado no *campus* de Ciências Agrárias, serve em média 550 almoços por dia, 130 cafés da manhã e não serve jantar por não ter curso noturno no *campus*.



No período de administração pelo DCE, o RU Central servia somente almoço, de segunda à sexta-feira. Na década de 80, com a administração da UFPR, começou a servir almoço e jantar, de segunda à sexta-feira. O RU Politécnico começou a fornecer jantar somente em setembro de 2002. Os cafés da manhã foram introduzidos em 2011 nos restaurantes universitários devido à pauta de reivindicação dos alunos à Reitoria na greve deste mesmo ano. Em fevereiro de 2012, também por solicitação dos alunos, o Restaurante Central passou a servir café da manhã, almoço e jantar aos sábados, domingos e feriados, para atender aos estudantes das Casas dos Estudantes Universitários e demais alunos de outras cidades que estudam na UFPR de Curitiba.

Os restaurantes de Palotina, UFPR Litoral e do *Campus* Centro de Estudos do Mar (CEM) em Pontal do Paraná foram criados com a expansão dos *campi* da UFPR, devido à política da Universidade de manter um restaurante em cada campus e beneficiar a comunidade universitária. O *Campus* Palotina iniciou suas atividades em 1993 com o curso de Medicina Veterinária e, em 2009, foram criados cinco novos cursos, Agronomia, Ciências Biológicas com ênfase em Gestão Ambiental, Tecnologia em Aquicultura, Biocombustíveis e Biotecnologia por meio do programa de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais - REUNI (UFPR, 2013b,d). O RU Palotina iniciou suas atividades em outubro de 2005 e fornece almoço e jantar, de segunda à sexta-feira.

Em 2005, por uma parceria entre Governo Federal, Estadual e Municipal, foi criada a UFPR Litoral em Matinhos, que veio para atender a necessidade de desenvolvimento sustentável do litoral e do Vale do Ribeira (UFPR, 2013c). O RU Litoral iniciou suas atividades no mesmo ano de criação do *campus*, servindo almoço e jantar de segunda à sexta-feira. O Centro de Estudos do Mar (CEM) foi criado com uma unidade de pesquisa da UFPR em 1980, com a sede inaugurada em 1982, porém, o restaurante iniciou as atividades apenas em março de 2006, também, assim como os outros, servindo almoço e jantar de segunda à sexta-feira. Os restaurantes destes *campi* são terceirizados, mas praticam o mesmo valor das refeições dos restaurantes de Curitiba. Em março de 2012, estes restaurantes iniciaram o fornecimento de café da manhã, almoço e jantar também aos finais de semana.

Em 2013, o custo da refeição por pessoa nos restaurantes universitários de Curitiba era de R\$ 9,53, incluindo todos os gastos. Descontado o valor pago pelos

estudantes (R\$ 1,30), servidores (R\$1,90) e professores (R\$2,40), a diferença do montante é complementada pela Reitoria e repassada à Administração dos restaurantes.

Neste prisma, as Universidades, juntamente com seus RUs, são responsáveis pela prática da Política de Segurança Alimentar e Nutricional e as instituições de ensino superior devem garantir a condição básica da alimentação como direito humano e fundamental, enquanto garantia constitucional, sendo certo que os estudantes universitários carecem de reconhecimento enquanto sujeitos deste direito. A alimentação universitária deve promover a saúde dos estudantes e, assim, garantir a sua permanência na Universidade, propiciando a sua formação integral.

Desta forma, entende-se que enquanto os diferentes setores do governo e da sociedade civil agirem isoladamente, não haverá uma política de SAN efetiva, conforme explica as diretrizes da política de SAN (CONSEA, 2004):

Intersetorialidade significa ações articuladas e coordenadas, utilizando os recursos existentes em cada setor (materiais, humanos, institucionais) de modo mais eficiente, direcionados para ações que obedeçam a uma escala de prioridades estabelecidas em conjunto. (...) Nem o governo nem as organizações da sociedade civil, agindo isoladamente, têm condições de garantir a segurança alimentar e nutricional da população de modo eficaz e permanente.

A Universidade deve também facilitar o acesso aos estudantes, funcionários e docentes a uma alimentação com preço baixo, pois o acesso regular aos alimentos pode não representar uma condição de SAN, caso o custo da alimentação comprometa o acesso aos demais componentes de uma vida digna como a educação, a saúde, a habitação e o lazer.

Ademais, o acesso aos alimentos engloba não apenas comer regularmente, mas também comer bem, com alimentos de qualidade e adequados aos hábitos culturais, com base em práticas saudáveis e que preservem o prazer associado à alimentação. Todo cidadão deve estar seguro em relação aos alimentos e alimentação nos aspectos da suficiência, qualidade e adequação (LEÃO E MALUF, 2012). Assim, as Universidades devem reconhecer que a alimentação é parte vital da cultura dos estudantes e devem levar em conta seus costumes e tradições em relação à alimentação.

Os alimentos também devem ser seguros do ponto de vista microbiológico e os restaurantes universitários têm a responsabilidade de realizar um controle para redução de riscos de transmissão de doenças pelos alimentos (ABRANDH, 2005). Sob esta ótica de qualidade, a segurança alimentar significa garantir ao consumidor alimentos de boa qualidade, livres de contaminação de natureza química, biológica ou física, ou de qualquer outra substância que possa acarretar problemas à sua saúde (ORTEGA E BORGES, 2012).

Em setembro de 2012, passou a vigorar a Resolução 50/2012 que permite a compra institucional dos produtos da agricultura familiar, através do Programa de Aquisição de Alimentos (PAA), para estados, municípios e outros órgãos do Governo Federal, além do Ministério do Desenvolvimento Social e Combate à Fome (MDS), Ministério do Desenvolvimento Agrário (MDA) e Companhia Nacional de Abastecimento (Conab). As compras pelo PAA foram permitidas para instituições que fornecem refeições regularmente a uma população específica, como presídios, hospitais, quartéis e restaurantes universitários (BRASIL, 2012). Os restaurantes universitários da UFPR foram os primeiros no Brasil a assinar a aquisição dos produtos da agricultura familiar (BRASIL, 2013). Com isto, os RUs, estão colaborando para fortalecer a agricultura familiar e contribuindo para a promoção da soberania alimentar e da segurança alimentar e nutricional dos estudantes, funcionários e docentes da UFPR.

Os restaurantes universitários, como responsáveis pela produção e distribuição de refeições culturalmente diversificadas, seguras do ponto de vista nutricional e sanitário, equilibradas e economicamente acessíveis, podem contribuir para a consolidação da Política de Segurança Alimentar e Nutricional do país, garantindo assim, o direito humano e constitucional – em relação exclusiva ao povo brasileiro - à uma alimentação adequada.

## 2.2 BOAS PRÁTICAS EM SERVIÇOS DE ALIMENTAÇÃO

A ocorrência de DTA vem aumentando de modo significativo em nível mundial e constitui um importante problema de saúde em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Vários são os fatores que contribuem para a emergência dessas doenças, dentre os quais se destacam: o crescente aumento das populações, a

existência de grupos populacionais vulneráveis, o processo de urbanização desordenado e a necessidade de produção de alimentos em grande escala. Contribui ainda, o controle deficiente dos órgãos públicos e privados, relativo à qualidade dos alimentos ofertados às populações (BRASIL, 2010; ACADEMY OF NUTRITION AND DIETETICS, 2013).

Os fatores que contribuem para a contaminação de alimentos em serviços de alimentação incluem matéria-prima crua contaminada, manipulação inadequada, armazenamento e refrigeração inadequada, práticas de descongelamentos impróprios, cocção inadequada, higiene pessoal precária, manipuladores de alimentos infectados, falta de higiene nas instalações e utensílios, panos de prato e esponjas de louça, alimentos preparados com muita antecedência (BOLTON E MAUNSELL, 2004). Estudos demonstram que a implementação de sistemas como Boas Práticas (BP) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) melhora a segurança de refeições servidas, no entanto, surtos de origem alimentar ainda ocorrem (ACADEMY OF NUTRITION AND DIETETICS, 2013).

Preocupado com a garantia da produção de alimentos seguros, o Ministério da Saúde publicou em 26 de novembro de 1993, a Portaria nº 1428 que aprova o “Regulamento Técnico para Inspeção Sanitária de Alimentos”, as “Diretrizes para o Estabelecimento de Boas Práticas de Produção e de Prestação de Serviços na Área de Alimentos” e o “Regulamento Técnico para o Estabelecimento de Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ’s) para Serviços e Produtos na Área de Alimentos” com o objetivo de estabelecer as orientações necessárias que permitam executar as atividades de inspeção sanitária, de forma a avaliar as Boas Práticas para a obtenção de padrões de identidade e qualidade de produtos e serviços na área de alimentos com vistas à proteção da saúde da população (BRASIL, 1993). Esta Portaria cita que:

“[...] sempre que achados clínicos ou o resultado de pesquisa ou estudos específicos e investigação epidemiológica demonstrarem a ocorrência de dano à saúde devido a produtos, procedimentos, equipamentos, utensílios, deve-se intervir no sentido de proibir o uso/comercialização imediata do produto, modificar os procedimentos e substituir equipamentos e utensílios, se for o caso, tendo a saúde do consumidor como fundamento e a saúde do manipulador de alimentos como fator limitante” (BRASIL, 1993).

Em 1997, a Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde estabeleceu requisitos essenciais de higiene e de Boas Práticas de Produção/Fabricação de Alimentos com a finalidade de obter alimentos aptos para consumo humano através da Portaria nº 326 de 30 de julho (BRASIL, 1997). Mais tarde, considerando a necessidade de um instrumento de verificação destes requisitos essenciais de higiene e de Boas Práticas de Fabricação, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou em 2002 a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 275 de 21 de outubro que dispõe sobre o Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados Aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos e a Lista de Verificação de Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos, sendo esta última muito utilizada também nos serviços de alimentação e nutrição (BRASIL, 2002).

Baseado na Portaria nº 1428/93, em 2004 o Ministério da Saúde, juntamente com a ANVISA, publicou a RDC nº 216 de 15 de setembro de 2004 (BRASIL, 2004) que dispõe sobre o Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação a fim de garantir as condições higiênico-sanitárias do alimento preparado. Essa resolução dispõe, além de outros itens, sobre a higiene das instalações, equipamentos, móveis e utensílios, o abastecimento de água e sobre os manipuladores de alimentos:

“[...] 4.2.1 - As instalações, os equipamentos, os móveis e os utensílios devem ser mantidos em condições higiênico-sanitárias apropriadas. As operações de higienização devem ser realizadas... com frequência que garanta a manutenção dessas condições e minimize o risco de contaminação do alimento [...]”

“[...] 4.4.1 - Deve ser utilizada somente água potável para manipulação de alimentos [...]”

“[...] 4.6.4 Os manipuladores devem lavar cuidadosamente as mãos ao chegar ao trabalho, antes e após manipular alimentos, após qualquer interrupção do serviço, após tocar materiais contaminados, após usar os sanitários e sempre que se fizer necessário [...]”

De acordo com os dados do Relatório de Situação do Paraná no Sistema Nacional de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (2011), no período de 2007 a 2011, o estado do Paraná notificou 138 surtos de DTA, com ocorrência de um

óbito em 2008. Excluindo os surtos sem informação, 48,1% ocorreram em residências e 12% em restaurantes/padarias; 32,4% dos surtos foram causados pelo consumo de alimentos cárneos e 6% por água. *Salmonella spp.* e *Staphylococcus spp.* foram detectados, respectivamente, em 26,5% e 22,4% dos surtos em que foi realizada a pesquisa de agentes etiológicos (BRASIL, 2011b).

No Brasil, a notificação de DTA tornou-se obrigatória pela Portaria nº 104 de 25 de janeiro de 2011 (BRASIL, 2011c), mas somente para surtos ocorridos em navios e aeronaves. Dados de 2011 da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde demonstram que os agentes etiológicos identificados na maioria das doenças transmitidas por alimentos entre os anos de 2000 e 2011 foram *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* (toxina), *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* (toxina), sendo transmitidos pela ingestão de alimentos e água contaminados (BRASIL, 2011d). Neste período, os surtos de origem alimentar no Brasil envolveram cerca de 180.000 pessoas e 88 mortes (NUNES, MOTA E CALDAS, 2013). Porém, a maioria dos casos não é relatada, devido à subnotificação e ausência de um sistema completo de monitoramento em saúde (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Segundo o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) (2013a) um total de 19.531 infecções confirmadas em laboratório, 4.563 hospitalizações e 68 óbitos associados à DTA foram relatados nos Estados Unidos em 2012. Os principais agentes envolvidos foram *Salmonella* (7.800 casos), *Campylobacter* (6.793 casos), *Shigella* (2.138 casos), toxina Shiga produzida por *Escherichia coli* não-O157 (551 casos), toxina Shiga produzida por *Escherichia coli* O157 (531 casos), *Vibrio* (193 casos), *Yersinia* (155 casos) e *Listeria* (121 casos).

Considerados como os principais causadores de DTA, os micro-organismos, particularmente bactérias, podem ser encontrados em todos os lugares. Estão presentes no ar, água e solo, superfícies das plantas bem como na boca, nariz e intestino dos animais, incluindo os seres humanos. De qualquer forma, é possível controlar e minimizar o número de micro-organismos presentes nos alimentos através do uso das boas práticas de higiene (WHO, 1999), como lavagem e sanitização de superfícies e utensílios de contato com alimentos, lavagem e antisepsia das mãos de manipuladores e higienização dos reservatórios de água e troca dos elementos filtrantes.

## 2.3 HIGIENIZAÇÃO DE SUPERFÍCIES DE CONTATO COM ALIMENTOS

Muitos estudos têm avaliado o nível de contaminação microbiológica em superfícies de contato com alimentos em serviços de alimentação em escolas, creches e hospitais (COSBY *et al.*, 2008; DOMÉNECH-SÁNCHEZ *et al.*, 2011; GARAYOA *et al.*, 2011; LEHTO *et al.*, 2011; MARZANO E BALZARETTI, 2011; RODRIGUEZ *et al.*, 2011; NASOPOULOU *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2013), porém, estudos realizados especificamente em restaurantes universitários não foram encontrados.

A contaminação cruzada por superfícies de contato com alimentos é uma das principais preocupações de segurança em serviços de alimentação. A sobrevivência e o crescimento de micro-organismos no ambiente de processamento de alimentos podem conduzir a uma contaminação no produto final, resultando em redução da segurança e da qualidade microbiológica dos alimentos (MASUKU *et al.*, 2012). Sabe-se que o nível de contaminação das superfícies está relacionado com o método de limpeza e que uma limpeza regular e eficiente pode ser mais importante do que o uso de desinfetantes como parte do procedimento de higienização (TEBBUTT, 1984).

Muitas das contaminações microbiológicas do ambiente estão relacionadas com matéria-prima crua, atividades de manipulação inadequadas, práticas de limpeza, sanitização e manutenção inadequada, lixo, animais e insetos e componentes estruturais do edifício. Entretanto, mesmo após a limpeza e desinfecção, a eliminação completa de micro-organismos patogênicos do ambiente de processamento de alimentos muitas vezes é difícil, particularmente quando esses são capazes de aderir às superfícies e permanecer viáveis (APHA, 2001; GÓMEZ *et al.*, 2012).

Nos serviços de alimentação existem inúmeros fatores que influenciam a sobrevivência dos micro-organismos. Uma delas é o desenho anti-higiênico de equipamentos, que os torna de difícil limpeza e desinfecção. Desta forma, estas superfícies de contato podem promover o crescimento de micro-organismos patogênicos e esporogênicos que podem ser transferidos diretamente para o alimento ou transportados pelos manipuladores (APHA, 2001; GÓMEZ *et al.*, 2012).

Os utensílios utilizados no preparo de alimentos também podem atuar como fonte de contaminação. O contato de utensílios com produtos crus, por exemplo,

podem promover a contaminação cruzada de patógenos no caso de serem usados para alimentos prontos para consumo sem passarem por um processo de limpeza adequado, representando uma ameaça para segurança do alimento (WHO, 1999).

### 2.3.1 Limpeza e desinfecção

Segundo a *Food and Drug Administration* (2009a), limpeza e desinfecção de superfícies de contato com alimentos e utensílios são os procedimentos que mais necessitam de atenção para prevenção da contaminação cruzada em alimentos, a qual pode influenciar sobre a sua segurança. Howeels *et. al* (2008) identificaram os principais motivos que levam os funcionários a não realizarem uma limpeza eficiente das superfícies de contato com alimentos em serviços de alimentação, entre elas a falta de tempo, treinamento inadequado, falta de recursos, desvalorização da tarefa pelo funcionário e pela gerência, nenhum incentivo para realizar a prática e outras atividades mais urgentes a serem realizadas.

Um processo de higienização inadequado pode não eliminar partículas de alimentos ou de água, o que permite o crescimento de micro-organismos deteriorantes e patogênicos que poderão contaminar alimentos e colocar em risco a saúde dos consumidores (GÓMEZ *et al.*, 2012). Com uma desinfecção ineficaz, as superfícies podem parecer limpas, mas continuar inaceitáveis microbiologicamente, podendo contribuir na transmissão de patógenos veiculados pelos alimentos, principalmente utilizando como veículo aqueles produtos que não serão submetidos ao calor, aumentando o risco de surtos de origem alimentar (KOO *et al.*, 2013).

A higienização tem dois objetivos: 1) remover o resíduo e o alimento aderido ao equipamento ou superfície (limpeza); 2) remover os micro-organismos viáveis (desinfecção). Estes objetivos podem ser facilmente alcançados pela lavagem com água quente ou pela lavagem cuidadosa com água e detergente seguida de desinfecção com produtos específicos para eliminação dos micro-organismos que ainda podem estar aderidos, visto que o processo de limpeza permite apenas a remoção de 90% dos micro-organismos das superfícies (WHO, 1999; SREY, JAHID E HÁ, 2013).

Selecionar uma combinação eficaz de materiais de limpeza e produtos de desinfecção é essencial para higienização das superfícies de contato (MASUKU *et al.*, 2012). A desinfecção complementa o procedimento de higienização,



assegurando a qualidade microbiológica das superfícies. De qualquer forma, a eficácia da desinfecção pode depender do desinfetante utilizado e sua limitação na presença de material orgânico, como gorduras, hidratos de carbono, proteínas, além de outros fatores como pH, temperatura, dureza da água, inibidores químicos, concentração e tempo de contato (SREY, JAHID E HÁ, 2013). Dentre os mais utilizados estão o álcool e desinfetantes a base de cloro.

A desinfecção deve ser realizada, de preferência, imediatamente antes do uso de equipamento, pois, após as etapas de limpeza, pode ocorrer a multiplicação de micro-organismos indesejáveis que não foram eliminados ou, mesmo, a recontaminação ambiental das superfícies (ANDRADE, 2008).

O planejamento dos procedimentos de higienização deve considerar o que limpar (equipamentos, utensílios, móveis); como fazer, quais produtos a utilizar, quem irá realizar (responsável) e quando realizar (frequência). É necessário, também, que a empresa estabeleça uma forma de monitorar estes procedimentos através de controles. Deve-se ter atenção aos produtos químicos utilizados para a limpeza e desinfecção. Estes devem ser aprovados por órgãos competentes e utilizados conforme instruções de diluição, tempo de contato, temperatura da água e necessidade de enxágue (TONDO E BARTZ, 2012).

### 2.3.2 Formação de biofilmes

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) abrangem um amplo número de doenças desencadeadas pelo consumo de alimentos contaminados por micro-organismos. Esta contaminação pode ocorrer em qualquer etapa do processo de produção dos alimentos e muitos surtos de origem alimentar podem estar associados com contaminação através de biofilmes formados nas superfícies de contato (CARRASCOSA *et al.*, 2012; SREY, JAHID E HÁ, 2013). Superfícies que, após a higienização, permanecem com resíduos de alimentos podem promover o crescimento bacteriano e a formação de biofilmes (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Em superfícies com resíduos de matéria orgânica, os micro-organismos depositam-se, aderem-se, interagem com as superfícies e iniciam o crescimento celular. Ao se multiplicarem formam colônias e polímeros extracelulares aos quais são agregados resíduos de alimentos e outros micro-organismos, formando-se o que é denominado biofilme microbiano. Este biofilme, na presença de calor, pode

cristalizar e formar depósitos ou crostas muito aderentes, protegendo novos micro-organismos e dificultando os procedimentos de higiene, constituindo potenciais focos de contaminação cruzada para outros alimentos, pois podem se desprender e contaminar outras superfícies e alimentos (SILVA Jr., 2005; ANDRADE, 2008; TONDO E BARTZ, 2012; MONTAÑEZ-IZQUIERDO, SALAS-VÁZQUEZ, RODRÍGUEZ-JEREZ 2012).

De acordo com Costerton *et al.* (1995), durante o complexo processo de adesão, as células bacterianas modificam o seu fenótipo em resposta a aproximação da superfície em que irão aderir. Durante os primeiros estágios de formação do biofilme, bactérias sésseis, agregadas às superfícies sólidas, se encontram numa justaposição estável com células de micro-organismos da mesma espécie e também com outras espécies, formando colônias de uma única espécie e colônias de várias espécies juntas. Diferentes bactérias formadoras de biofilmes respondem as suas condições microambientais específicas com diferentes padrões de crescimento. Cooperação fisiológica é o fator mais importante na formação da estrutura e em estabelecer eventuais justaposições que permitem uma aderência eficiente nas superfícies.

Assim, qualquer tipo de micro-organismo, tanto deteriorante como patogênico pode formar biofilmes. Os micro-organismos normalmente encontrados nos biofilmes são: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fragi*, *Micrococcus* sp. *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* sp. e *Escherichia coli*. Desta forma, se não houver uma higienização efetiva em intervalos regulares, certamente haverá condições favoráveis ao crescimento microbiano e formação de biofilmes (SILVA Jr., 2005; ANDRADE, 2008; SREY, JAHIRD E HÁ, 2013).

Equipamentos e utensílios com desenho anti-higiênico podem contribuir para a formação e permanência de biofilmes, pois dificultam a desmontagem e higienização adequada, não permitindo que biofilmes sejam removidos (TONDO E BARTZ, 2012). No entanto, todas as superfícies comumente utilizadas nos serviços de alimentação onde se processam alimentos, como vidro, borracha, aço inoxidável e polipropileno, são propícias à formação destas matrizes biológicas. Os micro-organismos formadores de biofilmes são mais resistentes a mudanças ambientais e a sanitizantes. Esta resistência pode ser atribuída à sua fisiologia alterada, por receberem menos oxigênio e nutrientes e devido à lenta difusão dos sanitizantes pela matriz formada (BOWER, MCGUIRE E DAESCHEL, 1996; MEIRA *et al.*, 2012;).

Fatores que afetam a fixação e formação desta matriz de micro-organismos incluem as propriedades físico-químicas do material da superfície, a disponibilidade de nutrientes, a umidade relativa (UR), o pH e a temperatura. Desse modo, a escolha de um agente antimicrobiano deve ser cuidadosamente realizada, levando-se em conta os contaminantes microbianos potenciais e o tipo de superfície. A sanitização de equipamentos e utensílios com água quente acima de 55°C é o mais efetivo agente para eliminar biofilmes, pois penetra facilmente naqueles mais profundos e mata as células, porém não remove o biofilme, o qual pode ser removido por agentes químicos. Desta forma, a combinação da água quente e um agente químico é uma intervenção importante para prevenir surtos de origem alimentar causadas por biofilmes bacterianos (ANDRADE, 2008; PINTO, KANEKO E PINTO, 2010; CARRASCOSA *et al.*, 2012; SREY, JAHID E HÁ, 2013).

### 2.3.3 Controle e monitoramento do processo de limpeza e desinfecção

A detecção de micro-organismos após a higienização de superfícies está entre os métodos diretos utilizados para avaliar a limpeza de estabelecimentos produtores de alimentos (OLIVEIRA *et al.*, 2014). O monitoramento consiste em acessar ou dimensionar parâmetros no sentido de estimar as condições da área, produto ou processo, objetivando confirmar ou não o atendimento aos padrões estabelecidos para definir, em tempo hábil, as ações necessárias, dependendo de se atingir limites de alerta ou de ação (PINTO, KANEKO E OHARA, 2003). O monitoramento microbiológico na produção e processamento de alimentos visa proteger os consumidores contra os agentes patogênicos e garantir a qualidade dos alimentos, identificando riscos microbianos em superfícies de contato com alimentos (CARRASCOSA *et al.*, 2012).

A análise microbiológica das superfícies de contato com alimentos é uma ferramenta útil para verificar a eficácia do processo de limpeza e sanitização, o qual é de difícil detecção apenas pela observação. O acompanhamento regular das práticas de limpeza pelo monitoramento microbiológico pode colaborar para a prevenção de potenciais surtos de origem alimentar, pois permite determinar a frequência necessária para limpeza e desinfecção e determinar a presença e fonte de contaminação de patógenos no ambiente possibilitando o estabelecimento de um programa de limpeza e desinfecção (APHA, 2001; TEBBUTT, 2007; MASUKU *et al.*,

2012). A combinação de análises microbiológicas com treinamento em boas práticas tem uma influencia positiva direta sobre o processo de higienização e a segurança do alimento em restaurantes (SORIANO *et al.*, 2002).

Silva Jr. (2005) classifica as condições do ambiente analisado da seguinte forma:

- Condições higiênico-sanitárias insatisfatórias: presença de *Salmonella* sp, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*;
- Condições higiênicas insatisfatórias: presença de micro-organismos mesófilos em contagem acima do recomendado ( $>50$  UFC/cm<sup>2</sup>).

Assim, é reconhecido que a avaliação do procedimento de higienização de equipamentos e utensílios que entram em contato direto com os alimentos é necessária para garantir a qualidade dos alimentos e a segurança aos consumidores. Desta forma, o monitoramento através de análises microbiológicas permite verificar se as condições higiênicas previamente estabelecidas foram atendidas visando uma produção de alimentos microbiologicamente seguros (ANDRADE, 2008; LEHTO *et al.*, 2011).

#### 2.3.3.1 Micro-organismos indicadores de condições sanitárias

O termo micro-organismo indicador foi sugerido por Ingram em 1977, para um organismo marcador cuja presença indicasse a possível presença de um patógeno ecologicamente similar (FORSYTHE, 2002). Na área de segurança alimentar e do meio ambiente, a partir do início do século XX, foi adotado o uso de micro-organismos indicadores, como as bactérias do grupo coliforme, para a avaliação e controle da qualidade higiênico-sanitária dos alimentos e da água. A aplicação dessa metodologia era justificada pela dificuldade na enumeração dos patógenos (DUBUGRAS E PÉREZ-GUTIÉRREZ, 2008).

Micro-organismos indicadores podem desempenhar um papel fundamental nas boas práticas ou outro sistema de gestão de segurança de alimentos, pois sua detecção e enumeração são amplamente usadas para verificar a eficácia dos programas de sanitização (LUES E VAN TONDER, 2007). Sua presença pode indicar falha no processamento, práticas de higiene inadequadas, implementação

insuficiente das boas práticas durante e após a manipulação dos alimentos e uma potencial contaminação por patógenos, porém sua presença não é um índice confiável da presença de um patógeno, visto que ocorrem com maior frequência que estes (MOORE E GRIFFITH, 2002; TEBBUTT, 2007; NASOPOULOU *et al.*, 2012).

Os micro-organismos indicadores devem apresentar certas características importantes: serem detectáveis de forma fácil e rápida; terem histórico de associações com o patógeno cuja presença visa a indicar; estarem presentes quando o patógeno de interesse estiver presente; apresentarem características e taxas de crescimento equivalentes às do patógeno; apresentarem uma taxa de mortalidade que seja ao menos paralela à do patógeno e, de preferência, que persistam por mais tempo do que este último (JAY, 2005). Os micro-organismos indicadores associados com boas práticas de higiene incluem entre outros, contagem total de bactérias, coliformes totais, *E. coli* (membros da família das Enterobactérias) e *Staphylococcus* coagulase positivo (LUES E VAN TONDER, 2007).

#### 2.3.3.1.1 Contagem total de bactérias

A Contagem Total de Aeróbios Mesófilos em placas, também denominada Contagem Padrão em Placa é o método mais utilizado como indicador geral de populações bacterianas. Não diferencia tipos de bactérias, sendo utilizado para se obter informações gerais sobre a qualidade, práticas de manipulação e higiene e condições de processamento. Não é um indicador de segurança, pois não está diretamente relacionado à presença de patógenos ou toxinas, mas sim a micro-organismos que poderão causar deterioração ou reduzir a vida de prateleira dos alimentos. Pode ser útil na avaliação da qualidade sanitária, pois populações altas de bactérias mesófilas demonstram deficiência na sanitização ou falha no controle do processo que podem indicar condições ideais para a multiplicação de patógenos (FRANCO, 2008; SILVA *et al.*, 2010).

#### 2.3.3.1.2 Coliformes totais e Coliformes termotolerantes

O grupo dos coliformes totais é um subgrupo da família *Enterobacteriaceae* e são definidos como bactérias Gram-negativas, anaeróbias facultativas em forma de

bastonetes, não formadoras de esporos. Usualmente fermentam a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas a 35-37°C. Os métodos mais modernos detectam diretamente a atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase, envolvida no metabolismo fermentativo da lactose, incorporando substratos para a enzima nos meios de cultivo (ENVIRONMENT AGENCY, 2002). Mais de 20 espécies se encaixam nesta definição, dentre as quais se encontram tanto bactérias originárias do trato gastrointestinal de humanos e de outros animais de sangue quente (*Escherichia coli*), como também bactérias não entéricas encontradas no ambiente (espécies de *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Hafnia*, dentre outras) (SILVA, *et al.*, 2010).

Coliformes termotolerantes, comumente chamados de coliformes fecais, são um subgrupo dos coliformes totais capazes de fermentar a lactose em 24 horas a 44,5°C, com produção de gás. Essa definição objetivou, em princípio, selecionar apenas as enterobactérias originárias do trato gastrointestinal (*E.coli*), porém, estes micro-organismos têm sido documentados em locais com ausência recente de contaminação fecal (APHA, 2012).

A *E.coli* está incluída tanto no grupo dos coliformes totais quanto no dos coliformes termotolerantes. A maioria das cepas de *E. coli* possui a enzima  $\beta$ -glicuronidase, o qual pode ser detectado por substratos cromogênicos e fluorogênicos (ENVIRONMENT AGENCY, 2002). *Escherichia coli* é uma das espécies entéricas predominantes no intestino humano, embora também possa ser introduzida nos alimentos a partir de fontes não fecais e, como parte da flora intestinal normal, algumas destas espécies proporcionam muitos benefícios para a saúde do hospedeiro, por exemplo, evitam a colonização do intestino por agentes patogênicos prejudiciais (FDA, 2012).

Os coliformes totais e termotolerantes não são habitantes obrigatórios do trato intestinal de animais de sangue quente e podem ser encontrados em reservatórios ambientais, o que pode ser considerado uma desvantagem no uso destes como indicadores. Dentre as principais aplicações destes micro-organismos estão a indicação das condições de higiene dos processos de fabricação, porque são facilmente inativados pelos desinfetantes e capazes de colonizar vários nichos das plantas de processamento, quando a sanitização é falha, além de estarem relacionados a uma maior probabilidade de presença de patógenos entéricos (SILVA, *et al.*, 2010).

Em outras partes do corpo que não o intestino, a *E. coli* pode causar algumas doenças como infecções do trato urinário. Certas cepas de *E. coli* podem causar enterite ou gastroenterite por meio de seis mecanismos distintos (WHO, 2008):

- *E.coli* enterotoxigênica (ETEC) – comumente conhecida como causadora de diarreia em viajantes. Causa diarreia aquosa, habitualmente sem sangue e muco, frequentemente acompanhada de cólicas abdominais leves;
- *E. coli* enteropatogênica (EPEC) – causa diarreia em crianças, habitualmente em lactentes. Causa vômitos, febre baixa e diarreia aquosa contendo muco, mas sem sangue visível;
- *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) – causa febre, colite, tenesmo e diarreia aquosa profusa contendo muco e sangue;
- *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC) – causa diarreia sanguinolenta, colite hemorrágica, síndrome urêmica hemolítica e púrpura trombótica trombocitopênica (ex: *E. coli* O157:H7);
- *E. coli* enteroagregativa (EAEC) – causa diarreia aquosa e mucóide durante mais de 14 dias, com febre baixa. Aderem à mucosa intestinal e produzem toxina termossensível e outra termoestável;
- *E. coli* difusamente adesiva (DAEC) – tem sido associada com diarreia aquosa sem sangue (FORSYTHE, 2002; WINN Jr. *et al.*, 2010).

Destes, os primeiros quatro grupos são bem conhecidos por serem transmitidos através de alimentos ou água contaminados (FDA, 2012).

#### 2.3.3.1.3 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* é caracterizado por micro-organismos Gram-positivos, imóveis, não formadores de esporos e catalase positivos, geralmente encontrados na pele e nas mucosas dos seres humanos e outros animais (WINN Jr. *et al.*, 2010). Podem ser transferidos para superfícies de contato com alimentos pelo não seguimento de Boas Práticas de Manipulação (BPM), como espirrar e tossir sobre as superfícies e não higienizar as mãos de forma adequada.

A espécie *Staphylococcus aureus* é, sem dúvida, o patógeno mais importante entre os estafilococos. Está frequentemente envolvida em intoxicações alimentares devido a enterotoxinas termoestáveis que produz em produtos lácteos, carnes e

peixes, capazes de eliminar micro-organismos competidores. As toxinas, resistentes às enzimas digestivas e ao pH baixo, são produzidas nos alimentos e ingeridas pré-formadas, provocando vômitos, diarreia, náuseas, mal estar e cólicas abdominais (SOLANO *et al.*, 2013). Os sintomas surgem dentro de 2 a 6 horas após a ingestão do alimento contaminado, desaparecendo após 8 a 10 horas (WINN Jr. *et al.*, 2010).

Apesar dos manipuladores de alimentos serem, normalmente, as principais fontes de contaminação, os equipamentos e as superfícies também veicular *S. aureus* (CDC, 2013b).

O grupo *Staphylococcus* coagulase positivo será abordado no item nº 2.4 - Lavagem e antisepsia das mãos de manipuladores de alimentos.

#### 2.3.3.2 *Enterococcus*

O gênero *Enterococcus* inclui os enterococos anteriormente classificados como estreptococos do grupo sorológico “D” de Lancefield. Esses micro-organismos são residentes normais dos tratos gastrointestinal e biliar e ocorrem em grande quantidade nas fezes humanas e de outros animais (WINN, Jr. *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2010).

São bactérias láticas Gram-positivas, não esporogênicas, anaeróbios facultativos, catalase e oxidase negativas, hidrolisam a esculina e são relativamente tolerantes ao cloreto de sódio (6,5% de NaCl) e a níveis de pH alcalinos. São normalmente esféricas ou ovóides, com menos de 2µm de diâmetro, ocorrem aos pares, em cadeias curtas ou isolados. São patógenos oportunistas e, em geral, são capazes de sobreviver em condições adversas (WHO, 2008; FDA, 2012).

Um subgrupo do gênero *Enterococcus* consiste nas espécies *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* e *E. hirae*. Este subgrupo é separado do restante dos estreptococos fecais por serem relativamente específicos para contaminação fecal. No entanto, alguns enterococos intestinais isolados de água podem, ocasionalmente, ter origem em outros *habitats*, incluindo solo, na ausência de contaminação fecal (WHO, 2008).

*E. faecalis* e *E. faecium* são os enterococos predominantes nas fezes humanas. Esse grupo é considerado um indicador secundário de contaminação fecal, pois são mais resistentes aos fatores ambientais e cloração do que as enterobactérias. A presença de *Enterococcus* fornece evidências de contaminação



fecal e de inadequação das práticas sanitárias. Desta forma, sua maior resistência pode ser útil na avaliação da eficiência de processos de desinfecção ambiental (ENVIRONMENT AGENCY, 2002).

Não há muita informação sobre doenças de origem alimentar relacionadas com *Enterococcus*. Em geral, *Enterococcus* representa uma grave ameaça para pessoas debilitadas por outras condições (FDA, 2012).

#### 2.3.3.3 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo Gram-negativo, móvel, com flagelo polar, não formador de esporos, aeróbico estrito, da família das *Pseudomonadaceae*. Produz catalase, oxidase e amônia a partir da arginina e pode utilizar o citrato como única fonte de carbono. Produz um pigmento hidrossolúvel, a pioverdina, que tem uma fluorescência branca a azul-esverdeada sob luz ultravioleta e são muito semelhantes à família das *Enterobacteriaceae*. Porém são habitantes habituais da água e ambientes úmidos, solo, fezes, alimentos e podem crescer com muito pouco nutriente (ENVIRONMENT AGENCY, 2002; WHO, 2008; WINN, Jr. et al. 2010).

*Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria deteriorante capaz de alterar alimentos ricos em proteínas, como leite, ovos, carnes e frutos do mar, além de vegetais devido a sua característica psicrófila, o que permite se multiplicarem em temperatura de refrigeração. São considerados importantes organismos patogênicos oportunistas em humanos, podendo causar infecções, incluindo septicemia, particularmente em pacientes imunossuprimidos, infecções em ferimentos e no trato respiratório, sendo resistente a maioria dos antibióticos. Raramente causam doenças graves em indivíduos saudáveis, mas podem causar intoxicação alimentar com enterites leves em adultos, porém com diarreia profusa em crianças (MASSAGUER, 2005; WHO, 2008).

A pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa* nas análises microbiológicas de amostras provenientes de superfícies de contato com alimentos é de grande importância para avaliação da eficácia dos processos e produtos utilizados para higiene nos serviços de alimentação (SILVA Jr, 2005).

## 2.4 LAVAGEM E ANTISSEPSE DAS MÃOS DE MANIPULADORES DE ALIMENTOS

O *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) estima que há mais de 76 milhões de casos de DTA por ano nos Estados Unidos, destes, 20% são causadas por agentes bacterianos resultantes da transmissão por manipuladores infectados (sintomáticos ou não) (GREIG *et al.*, 2007). A falta de higiene pessoal dos manipuladores de alimentos foi a segunda prática mais comumente relatada que contribuiu para surtos de DTA entre os anos de 1988 e 1992 nos Estados Unidos, a maioria envolvendo bactérias entéricas. Isto demonstra que a correta lavagem das mãos é um ponto de controle para prevenção da transmissão de organismos patogênicos pelos manipuladores de alimentos (FDA, 2000; CATURLA *et al.*, 2012).

Greig *et al.* (2007) realizaram uma síntese de documentos nos quais relataram os surtos alimentares relacionados com manipuladores de alimentos em todo o mundo. Entre os anos 2000 e 2006 eles identificaram 233 surtos, com 16.028 casos de intoxicação alimentar, a maioria em serviços de alimentação. Muitos desses surtos foram relacionados com práticas inadequadas de manipulação de alimentos, como contaminação cruzada entre produtos crus e cozidos e falta de higiene do manipulador, como práticas inadequadas de lavagem das mãos ao manusear alimentos prontos para consumo (MCINTYRE *et al.*, 2013).

O corpo humano é composto por aproximadamente  $10^{14}$  células, no entanto, abriga cerca de  $10^{13}$  células microbianas em nível intestinal, sendo que, muitas delas, podem provocar surtos alimentares se não forem observados cuidados durante a manipulação de alimentos (TONDO E BARTZ, 2012). Os manipuladores podem ser portadores assintomáticos de micro-organismos de origem alimentar (ACADEMY OF NUTRITION AND DIETETICS, 2013).

Desta forma, as mãos de manipuladores de alimentos podem ser o vetor de propagação de micro-organismos nocivos por meio de contaminação cruzada. Podem ser contaminadas ao manipular alimentos crus e/ou alimentos de origem animal, ao usar o banheiro, ao manusear utensílios sujos e ao manipular material de limpeza e lixo (FDA, 2013). Uma lavagem de mãos inadequada ou negligenciada pode resultar em até  $10^7$  patógenos sob as unhas. Quando úmidas, as mãos podem conduzir a um maior número de micro-organismos que colonizam a pele, facilitando

a disseminação ao aderir às superfícies que entram em contato com estas e, posteriormente, com os alimentos (ABD-ELALEEM *et al.*, 2014).

As bactérias do corpo humano podem ser classificadas como transitórias ou residentes, sendo o primeiro grupo composto pelas bactérias depositadas na pele por contato direto ou aerossóis e que são facilmente removidas pelo processo de higienização, e o segundo grupo, por aquelas que permaneceram nas mucosas e nos folículos pilosos e glândulas sebáceas da epiderme, onde a gordura e o epitélio dificultam a sua remoção. Por esse motivo, as mãos e demais partes do corpo permanecem com diversos micro-organismos em quantidades variáveis, mesmo após o banho ou adequada lavagem e antissepsia (TONDO E BARTZ, 2012).

Algumas das bactérias que podem ser encontradas nas mãos dos manipuladores de alimentos são os coliformes totais e *Escherichia coli* (exemplo de bactérias transitórias) e *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis* (bactérias residentes) (ABDUL-MUTALIB *et al.*, 2012). Os coliformes totais podem ser as bactérias Gram-negativas de maior importância nos manipuladores de alimentos, enquanto os *S. aureus* são os principais Gram-positivos que devem ser prevenidos pelas boas práticas de manipulação (TONDO E BARTZ, 2012). Outros micro-organismos, como bacilos Gram-negativos não fermentadores de glicose e fungos, não são bons indicadores de contaminação, podendo aparecer nas mãos mesmo após a higiene (SILVA JR., 2005).

De acordo com Lehto *et al.* (2011), a higienização das mãos é uma prática básica relacionada aos manipuladores de alimentos para proteção dos alimentos. Outra prática é o controle das doenças que o manipulador pode transmitir aos alimentos. Desta forma, a higiene dos manipuladores, particularmente a higiene das mãos, é crucial para redução da contaminação de alimentos, minimizando o risco de DTA. Abd-Elaleem *et al.* (2014) enfatizam que embora a lavagem das mãos pode parecer algo trivial para os manipuladores de alimentos, não fazê-lo pode ter consequências trágicas.

Na prática, a maioria dos surtos envolvendo o *S. aureus* resulta da falta de cuidados na manipulação dos alimentos e da desatenção com a higiene pessoal, que propiciam a contaminação dos alimentos, somada à falta de cuidados em relação à temperatura de armazenamento ou distribuição, as quais permitem a multiplicação da bactéria e subsequente produção de enterotoxinas (TONDO E BARTZ, 2012). Desta forma, os manipuladores de alimentos podem ajudar a reduzir

a intoxicação alimentar por meio da prevenção da contaminação dos alimentos e também impedindo o crescimento ou sobrevivência de bactérias viáveis nos alimentos através do controle de tempo e temperatura (CLAYTON *et al.*, 2002).

Assim, de uma forma ideal, os manipuladores de alimentos não devem apresentar coliformes totais ou outras *Enterobacteriaceae* após a lavagem e antissepsia das mãos. O manipulador deve lavar as mãos ao iniciar o trabalho, quando estas se apresentarem sujas, ao mudar de tarefa, após manipular alimentos crus, antes de manipular alimentos prontos para consumo e sempre que utilizar as instalações sanitárias e manipular lixo, com recomendação que a lavagem das mãos ocorra a cada uma hora (SÃO JOSÉ, 2012). Segundo Snyder (1998) o procedimento mais efetivo para a remoção de micro-organismos transitórios é a lavagem das mãos e antebraços com água e sabão e correta secagem com papel toalha, dando a devida atenção às pontas dos dedos e região entre os dedos.

As mãos devem ser lavadas corretamente mesmo ao utilizar luvas para manipular alimentos prontos para consumo, pois os micro-organismos podem aderir na superfície das luvas e estas tornarem-se veículos de contaminação cruzada. O uso de luvas deve ser limitado para uma única tarefa e recomenda-se que seja trocada com frequência, pois o uso da luva cria um ambiente ótimo para o crescimento de microrganismos, mantendo as mãos úmidas, quentes e protegidas. Por isso, sugere-se que as mãos também sejam lavadas depois de utilizar luvas (SNYDER, 1998).

Erros durante a manipulação de alimentos são fáceis de ocorrer, resultando em ameaça para segurança do alimento (WHO, 1999). Como muitas das causas dos surtos de DTA têm sido atribuídas às más práticas de manipulação, este segmento da população exige a educação sobre segurança alimentar, práticas adequadas de manipulação de alimentos e higiene pessoal e da importância da higiene e antissepsia das mãos para evitar a propagação de doenças infecciosas (MCINTYRE *et al.*, 2013; ABD-ELALEEM *et al.*, 2014). Educar os manipuladores de alimentos para prevenir DTA é um objetivo importante para a indústria de alimentos, serviços de alimentação e também para o governo (ABDUL-MUTALIB *et al.*, 2012). No entanto, as principais dificuldades para educar manipuladores, relatadas por Germano (2003) são: a baixa escolaridade, a dificuldade de compreender os conteúdos e visualizar a importância da manipulação adequada para garantir um

alimento seguro, bem como a rotatividade de mão de obra em serviços de alimentação.

Como o treinamento em Boas Práticas de Manipulação (BPM) contribui para melhoria do conhecimento do manipulador, e como este conhecimento declina ao longo do tempo, é recomendado que todos os manipuladores de alimentos recebam uma reciclagem periódica em BPM e um acompanhamento da frequência e da prática de higiene das mãos (FDA, 2009a; ABDUL-MUTALIB *et al.*, 2012; MCINTYRE *et al.*, 2013). O não seguimento destas práticas por falta de conhecimento ou negligência é um fator importante na prevalência de DTA (MARTINS, HOGG E OTERO, 2012). Howells *et. al* (2008) verificaram em seu estudo que as principais barreiras para lavagem e antissepsia das mãos mencionadas pelos manipuladores de alimentos em serviços de alimentação são a falta de tempo, falta de pias, pias em lugares inadequados ou de difícil acesso e a sensação de pele seca.

O correto conhecimento destas práticas de higiene e manipulação pelos manipuladores de alimentos é um dos fatores mais importantes para garantir uma boa qualidade e boa higiene durante o preparo dos alimentos (CAPUNZO *et al.*, 2005). No entanto, isto nem sempre resulta em mudanças positivas no comportamento dos manipuladores (KO, 2013), como reconhece um estudo realizado por Clayton *et al.*, (2002) em que 137 manipuladores entrevistados de pequenas e médias empresas de serviços de alimentação do Reino Unido admitem que nem sempre realizam todas as práticas de alimentos seguro que deveriam implementar.

Neste mesmo estudo, Clayton *et al.* (2002) apresentaram o conhecimento destes manipuladores em relação ao alimento seguro e a percepção sobre o risco e o controle que eles exerciam em suas práticas e ações durante a manipulação de alimentos. Ao realizar a pergunta “algo importante que vocês podem fazer para prevenção de intoxicações alimentares?”, 84% dos manipuladores responderam “lavar as mãos”. Em estudo semelhante, Osaili *et al.* (2013) mostraram que mais de 90% dos manipuladores que responderam ao questionário foram capazes de identificar as ocasiões em que precisavam lavar as mãos e que deveriam utilizar luvas para manipular alimentos prontos para consumo.

Como demonstrado, os manipuladores podem ser a maior fonte de contaminação dos alimentos. Existem muitas práticas de higiene que devem ser

observadas por eles: as mãos devem ser lavadas regularmente com água e sabão, principalmente antes de iniciar a manipulação dos alimentos, após ir ao banheiro, após tocar qualquer parte do corpo e após manipular alimentos crus, lixo ou material de limpeza, pois, em todos estes casos, as mãos ficam contaminadas com patógenos ou resíduos de produtos químicos tóxicos que podem ser transferidos aos alimentos (FDA, 2013).

Os manipuladores também devem evitar tossir ou espirrar nas mãos, tocar nos cabelos, nariz ou boca enquanto manipulam alimentos, comer, beber e fumar nas áreas de preparação de alimentos. Estas práticas adequadas de higiene por parte dos funcionários minimizam a possibilidade de transmissão de DTA (WHO, 1999).

#### 2.4.1 *Staphylococcus aureus* e manipuladores de alimentos

*Staphylococcus aureus* tem sido reconhecido por muito tempo como um dos mais importantes agentes de intoxicação alimentar no mundo. O principal *habitat* deste micro-organismo é a mucosa da nasofaringe e pele dos seres humanos e animais, podendo existir como microbiota permanente ou transitória, sem causar nenhum sintoma em 20-50% de indivíduos saudáveis. A presença de *S. aureus* em alimentos está frequentemente relacionada com manipulação inadequada pelos manipuladores (MALHEIROS *et al.*, 2010).

O *S. aureus* pode produzir doenças através de dois mecanismos diferentes. Um baseia-se na capacidade do micro-organismo se multiplicar e se difundir amplamente pelos tecidos, que resulta em manifestações tais como furúnculos, sepse de pele, infecções de feridas pós-operatórias, infecções entéricas, septicemia, endocardite e pneumonia, e a outra se baseia na capacidade do micro-organismo produzir enzimas extracelulares e toxinas nos alimentos, provocando intoxicação alimentar, caracterizada por vômitos, diarreia, dores abdominais, desequilíbrio eletrolítico e perda de fluidos. O início da doença, neste caso, tem um curto período de incubação de 1 a 8 horas (WHO, 2008).

O *S. aureus* é uma bactéria esférica (coco) Gram-positiva, anaeróbia facultativa, não móvel e não formadora de esporos, que ocorre em pares, em pequenas cadeias ou aglomerado irregulares (SORIANO *et al.*, 2002). O micro-organismo foi descrito pela primeira vez em 1879. É dividida em diversos biótipos,

tendo como base testes bioquímicos e padrões de resistência distinguindo-se dos demais estafilococos através de três testes: coagulação do plasma sanguíneo positivo; teste de DNase termooestável positivo e o teste de redução do telurito positivo (WHO, 2008; SILVA *et al.*, 2010).

Algumas espécies podem produzir pequenas quantidades de coagulase, razão pela qual apenas as cepas fortemente positivas nesse teste são consideradas como *S. aureus*. Os estafilococos são mesófilos, com crescimento entre 7°C e 47,8°C com temperatura ótima de crescimento de 35 a 40°C, os limites de pH para crescimento estão entre 4,5 e 9,3 e a atividade de água mínima é de 0,83, suportando concentrações de até 25% de cloreto de sódio (NaCl) (FDA, 2012).

Várias espécies de estafilococos, incluindo ambas as cepas de estafilococos coagulase negativa e coagulase positiva, têm a capacidade de produzir toxinas, entretanto o *S. aureus* (coagulase positivo) é o agente etiológico predominantemente associado com intoxicação alimentar estafilocócica. As espécies *S. epidermidis* e *S. saprophyticus* (coagulase negativos) também estão associadas a produção de enterotoxinas e doença em seres humanos (JAY, 2005; WHO, 2008).

Assim, a doença transmitida por *S. aureus* é uma intoxicação, provocada pela ingestão dessas toxinas pré-formadas no alimento, quando ocorre a multiplicação das células, principalmente do meio para o final da fase exponencial. É classificada pela *International Commission on Microbiological Specifications for Foods* (ICMSF) no grupo de risco III, que inclui doenças “de perigo moderado, usualmente de curta duração e sem ameaça de morte ou sequelas, com sintomas autolimitados, mas que causam severo desconforto” (SORIANO *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2010).

O *S. aureus* não resiste ao calor, sendo facilmente destruído na pasteurização ou na cocção dos alimentos, porém suas toxinas são proteínas de baixo peso molecular, termooestáveis e resistentes à cocção ou a enzimas proteolíticas (SILVA *et al.*, 2010). Hoje são conhecidas onze tipos de enterotoxinas – A, B, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, D, E, G, H, I e J – as quais podem ser diferenciadas por sorologia (SANT’ANA E AZEREDO, 2005). Sendo as enterotoxinas A, B e C as mais frequentemente encontradas em humanos e envolvidas em surtos alimentares (SORIANO *et al.*, 2002).

A ação proteolítica do trato intestinal e a resistência ao calor significa que é importante evitar o crescimento de *S. aureus* nos alimentos, mantendo-os armazenados em temperatura adequada (FORSYTHE, 2002). Uma dose menor que

1µg/kg em alimentos contaminados produzirá sintomas de contaminação. Este nível de toxina é alcançado quando as populações de *S. aureus* excedem 10<sup>5</sup> UFC/g de alimento (FDA, 2012).

Desta forma, não é necessário um manipulador de alimento apresentar uma infecção para constituir um risco à segurança alimentar. Os portadores assintomáticos de *S. aureus* na pele, nasofaringe e folículos pilares podem constituir este risco. Atividades que contribuem para o contato da mão com a boca, como fumar ou mascar chicletes, tabaco ou roer unhas podem também conduzir para uma contaminação que poderia ser evitada. O mesmo se aplica para degustação dos alimentos durante o preparo. Da mesma forma, não devem tossir, espirrar e cuspir sobre os alimentos ou tocar em qualquer parte do seu corpo. Logo, por precaução, os manipuladores não devem manipular alimentos prontos para consumo com as mãos desprotegidas, principalmente em alimentos que favorecem o crescimento deste micro-organismo (WHO, 1999).

Alimentos como carnes e produtos cárneos, frango, batata, produtos a base de ovos, produtos de confeitaria a base de creme, produtos lácteos e saladas mantidos em temperatura ambiente ou temperatura mais elevadas oferecem um ambiente ideal para a multiplicação de *S. aureus* e a liberação de toxinas. Os alimentos que requerem um tratamento considerável durante a preparação e são mantidos ligeiramente acima da temperatura de refrigeração adequada (>10°C) por um período prolongado após o preparo são frequentemente envolvidos em intoxicação alimentar estafilocócica (FORSYTHE, 2002; WHO, 2008; FDA, 2012).

Todd *et al.* (2007) investigaram 816 surtos no mundo ocorridos entre 1920 a 2006, nos quais os manipuladores de alimentos estavam envolvidos. Um destes surtos causado pelo agente *S. aureus*, ocorreu no Brasil em 1998, no qual 4000 pessoas ficaram doentes e 2000 foram hospitalizadas, com 16 mortes. Oito manipuladores de alimentos prepararam frango, carne assada, arroz e feijão 48 horas antes do evento. A maioria das preparações ficou armazenada em travessas de alumínio em temperatura ambiente até a manhã do dia do evento. Estes manipuladores apresentaram *S. aureus* nos *swabs* coletados das mãos e, cinco deles, apresentaram a mesma cepa isolada na região da nasofaringe. Na análise dos alimentos foram encontradas contagens de *S. aureus* de 2 x 10<sup>8</sup> UFC/g, quantidade capaz de produzir 6µg de enterotoxina/g de alimento.



No Brasil, segundo dados epidemiológicos de 2011 da Secretaria de Vigilância em Saúde, o *S. aureus* foi o segundo agente etiológico mais envolvido em surtos alimentares no período de 2000 a 2011, perdendo somente para *Salmonella* spp (FIGURA 1) (BRASIL, 2011d). Nos Estados Unidos a CDC estima que a intoxicação alimentar estafilocócica provoca cerca de 241.188 doenças, 1.064 internações e seis mortes a cada ano, porém a verdadeira incidência é desconhecida (FDA, 2012).

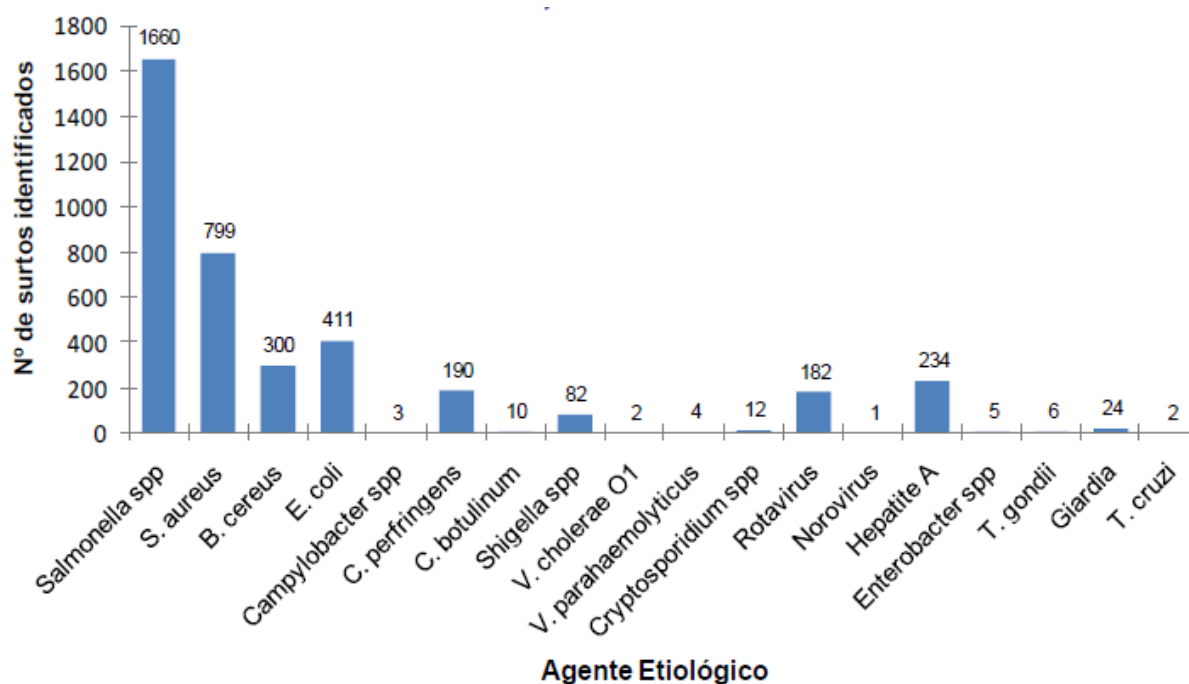


FIGURA 1 - AGENTES ETIOLÓGICOS IDENTIFICADOS POR SURTO NO BRASIL ENTRE OS ANOS 2000 E 2011  
 FONTE: BRASIL, 2011d

De acordo com Tondo e Bartz (2012), diversas pessoas permanecem com *S. aureus* mesmo após a correta lavagem e antissepsia das mãos, uma vez que elas fazem parte de suas microbiotas residentes e dificilmente são removidas por completo da pele. É possível que a pesquisa de coliformes totais e *E. coli* seja um parâmetro mais adequado para avaliar a correta higienização de mãos de manipuladores de alimentos, considerando que tais bactérias não fazem parte da microbiota das mãos e são, na maioria das vezes, facilmente removidas pela lavagem e antissepsia.

Todos estes dados confirmam a importância do controle da saúde e da prática de antissepsia das mãos dos manipuladores de alimentos, sendo estes fontes

potenciais de bactérias que podem ser veiculadas por alimentos devido à introdução de patógenos durante o seu processamento, distribuição e manipulação. A lavagem e antissepsia das mãos desempenha um papel importante no controle da propagação de doenças infecciosas. Dessa forma, para assegurar a qualidade da alimentação, a educação e o treinamento dos manipuladores são as melhores ferramentas (SÃO JOSÉ, 2012).

Gestores de serviços de alimentação precisam conhecer os riscos associados à manipulação de alimentos no seu local de trabalho e saber como gerir estes riscos. Ter dados técnicos, mediante monitoramento por análise microbiológica das mãos dos manipuladores, colabora para realizar avaliações contínuas dos procedimentos de BP de forma a assegurar uma alimentação com qualidade e segurança microbiológica.

## 2.5 MÉTODOS UTILIZADOS PARA ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE SUPERFÍCIES DE CONTATO COM ALIMENTOS E MANIPULADORES

A principal dificuldade ao examinar as superfícies ou utensílios de contato com alimentos é a remoção de porcentagens significativas da microbiota residente. Muitos métodos utilizados não conseguem amostrar todos os micro-organismos de uma área específica, ou seja, apenas uma pequena porção dos micro-organismos é recuperada (JAY, 2005). As superfícies e equipamentos deveriam estar livres de contaminação, porém nem sempre isto é possível. No entanto, o controle ambiental é fundamental para constatar o tipo de contaminação existente (MASSANGUER, 2005).

Os principais fatores que influenciam a escolha do método para avaliação de superfícies são o tipo de micro-organismo contaminante, sua concentração esperada, a geometria e condições das superfícies de contato, como ranhuras e resíduos de sanitizantes e alimentos e tipo de sanitizante utilizado (ANDRADE, 2008). Assim, a interpretação dos resultados pode ser limitada, o que torna difícil a formulação de padrões microbiológicos para superfícies de contato com alimentos (PATTERSON, 1971).

### 2.5.1 *Swab* ou Método cotonete

O método *swab* foi desenvolvido por Manheimer e Ybanez em 1917 e é considerado o padrão “A” pela *American Public Health Association*. O *swab* pode ser feito com a parte absorvente de fibra de poliéster, alginato de cálcio ou Rayon estéreis com hastes de plástico com cerca de 12 cm de comprimento. Podem ser utilizados moldes estéreis que delimitam uma área a ser amostrada ou, no caso de pequenas áreas, como válvulas, torneiras e talheres, o resultado pode ser expresso com base na peça inteira. O método *swab* é mais adequado para superfícies flexíveis e irregulares. É um dos métodos mais rápidos, simples e baratos para avaliar a contaminação de superfícies de contato com alimentos (JAY, 2005; MASSAGUER, 2005; ANDRADE, 2008).

O *swab* é umedecido num tubo com diluente estéril apropriado e esfregado em direções reversas dentro da área delimitada pelo molde na superfície a ser amostrada. Coloca-se o *swab* novamente no tubo com diluente, o qual é estocado e levado refrigerado até o laboratório onde será agitado e plaqueado em meios específicos, dependendo do organismo de interesse, estes deverão ser incubados em temperaturas apropriadas. Um diluente deve ser incorporado com agente neutralizador caso a superfície a ser amostrada tenha sido previamente higienizada com produtos desinfetantes. Os organismos no diluente são então quantificados por métodos apropriados. No geral, a quantidade de micro-organismos não pode exceder mais do que poucas colônias em superfícies adequadamente lavadas e higienizadas. Em alguns casos, o tipo de micro-organismo encontrado é mais significativo do que a contagem de micro-organismos (APHA, 2001).

Alguns fatores podem interferir na recuperação dos micro-organismos na superfície amostrada, como o material da superfície, o tempo que o *swab* é esfregado na superfície (que deve ser padronizado), a pressão e a velocidade aplicada ao *swab* na hora da coleta (PATTERSON, 1971).

### 2.5.2 Método da placa de contato (RODAC e laminocultivo)

Criada por Guderson e Guderson em 1945 e aperfeiçoada em 1964 por Hall e Hartnett, o método de replicação de organismos diretamente em ágar após contato (RODAC) utiliza placas de Petri com meio de cultura apropriado que ultrapassa a

borda da placa, formando uma superfície levemente convexa. Quando pressionado contra a superfície, o ágar entra em contato direto com a superfície a ser amostrada. As placas são então fechadas e incubadas em temperatura e tempo específicos para o micro-organismo de interesse, sendo, em seguida, contadas as Unidades Formadoras de Colônias. Um tempo de contato de 5 segundos sob pressão com a superfície é o suficiente para uma boa remoção dos micro-organismos. Deve ser utilizado apenas em superfícies planas, lisas e previamente higienizadas, porém pode ser utilizado em superfícies úmidas (JAY, 2005; MASSAGUER, 2005; ANDRADE, 2008).

Os laminocultivos são similares às placas de contato, devendo ser pressionados diretamente na superfície a ser amostrada. Assim, os micro-organismos que estiverem presentes na superfície irão contaminar o ágar e, consequentemente, se desenvolver (MOORE E GRIFFITH, 2002). O método rápido de análise em laminocultivo apresenta algumas combinações de meios de cultura, possibilitando seu emprego em situações diversas. Pode ser utilizado para contagem microbiana em amostras líquidas, sólidas ou superfícies (LABORCLIN, 2012). Este método foi utilizado e testado primeiramente para exames de urocultura, descritos em 1967 por Guttman & Naylor, em 1969 por Lorrier e Valkenburg e em 1972 por Craig e Kunin.

O método padrão para contagem de micro-organismos em superfícies e mãos de manipuladores é o *swab*, porém, ele requer pessoal treinado para executar a coleta e outras técnicas mais complexas como diluições, manipulação de pipetas, plaqueamento, etc. As placas de contato, assim como os laminocultivos, são tecnicamente menos complicadas, pois podem ser mergulhadas ou pressionadas diretamente no material a ser amostrado, além de outras vantagens como fácil transporte e incubação direta em estufa, sem necessidade de diluições (PATTERSON, 1971).

## 2.6 POTABILIDADE DA ÁGUA FILTRADA E ÁGUA DE TORNEIRA

A importância da água para a saúde e desenvolvimento tem refletido numa série de fóruns políticos internacionais. A Assembleia Geral da Organização das Nações Unidas (ONU) declarou o período de 2005 a 2015 como a Década

Internacional de Ação – “Água para a vida”, pois a água é essencial para manter a vida, e um fornecimento satisfatório (adequado, seguro e acessível) deve estar disponível para todos (WHO, 2008).

A Legislação brasileira considera que a água para consumo humano deve ser potável e destinada à ingestão, preparação e produção de alimentos e à higiene pessoal, independentemente da sua origem (BRASIL, 2011a). Água potável deve ser segura para todas as fases da vida, contemplando as diferentes sensibilidades que ocorrem ao longo da vida (BARTRAM *et al.*, 2003). Uma água com qualidade superior pode ser necessária para algumas finalidades especiais, como para diálise renal, produção de alimentos e uso farmacêutico (WHO, 2008).

O abastecimento de água potável envolve fonte de captação, tratamento e distribuição quando canalizada e também fontes não canalizadas como nascentes e poços (BARTRAM *et al.*, 2003). Desde a adoção de práticas de tratamento e desinfecção da água pelos serviços públicos, a incidência de doenças transmitidas pela água tem diminuído. No entanto a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que nos países em desenvolvimento milhões de crianças morrem de doenças infecciosas relacionadas com a água contaminada (FIGUERAS E BORREGO, 2010).

Os micro-organismos em geral, são encontrados comumente na água, solo e ar, no entanto, a contaminação da água por fezes pode transmitir uma variedade de bactérias patogênicas, vírus, protozoários e helmintos para as pessoas que a utilizam para beber ou preparar alimentos. A falta de água também é um problema para transmissão de doenças, pois a sua falta dificulta o processo de higienização e o cumprimento das boas práticas de manipulação de alimentos e higiene pessoal (WHO, 1999).

Além disso, a água também pode ser contaminada após o tratamento nos sistemas de distribuição devido a chuvas e inundações, e após a distribuição, através de defeitos na construção e estrutura de reservatórios de água, reparações nos sistemas de água, ausência de manutenção regular nas caixas d'água e mediante elementos filtrantes sujos, os quais podem permitir a entrada e proliferação de micro-organismos (FDA, 2009b). As moléculas orgânicas depositadas nos elementos filtrantes propiciam o crescimento microbiano e formação de biofilmes, havendo, portanto, necessidade de troca periódica dos filtros (PINTO, KANEKO E PINTO, 2010).

Os efeitos na saúde humana causados pela transmissão de doenças pela água podem variar de gastroenterites leves a diarreias fatais, disenteria, hepatite e cólera. Falhas ao garantir uma água potável e segura pode expor uma determinada comunidade ao risco de DTA devido à contaminação microbiológica nos sistemas de distribuição urbanos. Estas falhas têm o potencial de causar grandes surtos (WHO, 2008) devido à contaminação de vários alimentos ou preparações pela água contaminada (TONDO E BARTZ, 2012). Desta forma, a água atua como substrato para micro-organismos e é relevante que a legislação estabeleça padrões microbiológicos considerando o valor máximo aceitável de micro-organismos de forma a não colocar a saúde dos consumidores em risco (COELHO, PIMENTEL E BEUX, 1998), bem como desenvolva normas para proteção das fontes, tratamento, manutenção e distribuição de água potável (WHO, 2008).

Assim, de acordo com a Portaria 2.914 de 12 de dezembro de 2011 do Ministério da Saúde, água potável é aquela que atende ao padrão de potabilidade estabelecido e que não oferece riscos à saúde, logo, deve estar isenta de coliformes totais e *Escherichia coli*. Pode ser ainda verificada a contagem de bactérias heterotróficas (HPC) como indicadores de contaminação e para avaliar a integridade do sistema de distribuição (reservatório e rede), recomendando-se que não se ultrapasse o limite de 500 UFC/mL (BRASIL, 2011a).

#### 2.6.1 Coliformes totais e *Escherichia coli*

Muitos coliformes presentes em grande número no intestino de humanos e de animais de sangue quente são capazes de contaminar, direta ou indiretamente, a água para consumo humano (FIGUERAS E BORREGO, 2010). Sob o ponto de vista microbiológico pode-se afirmar que a potabilidade da água está associada à ausência de patógenos. Por sua vez, a patogenicidade está ligada à contaminação fecal. No entanto, considerando a dificuldade em pesquisar os patógenos de maneira direta, frente a sua sensibilidade quando em quantidades reduzidas, lança-se mão da pesquisa de indicadores de contaminação fecal (PINTO, KANEKO E OHARA, 2003). Como consequência, os coliformes totais são utilizados como indicadores da presença de micro-organismos patogênicos na água e nos ambientes (ROMPRÉ *et al.*, 2002). Sua presença não indica uma ameaça à saúde pública, mas

sim, que operações de tratamento precisam ser adequadamente avaliados (ENVIRONMENT AGENCY, 2002)

Entre os coliformes totais, a determinação específica de contaminação por *Escherichia coli* pode ser realizada como um dos melhores meios de estimar poluição fecal recente. Já os outros gêneros, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Serratia*, se encontram em grande quantidade no ambiente e não são necessariamente associados à contaminação fecal. Tanto a *Escherichia coli* quanto outros coliformes totais não devem estar presentes na água potável, a presença é um indicativo de tratamento inadequado da água e más condições do sistema de distribuição (ENVIRONMENT AGENCY, 2002; YÁÑEZ, VALOR E CATALÁN, 2006; SILVA *et al.*, 2008).

No entanto, estes indicadores têm limitações. Vírus entéricos e protozoários são mais resistentes à desinfecção, consequentemente, a ausência de *E. coli* não indica, necessariamente, a ausência destes organismos. Da mesma forma, a contaminação fecal não está distribuída uniformemente ao longo do sistema de distribuição, o que reduz a probabilidade de detecção de bactérias indicadoras nas poucas amostras coletadas para os testes microbiológicos (WHO, 2008).

As chances de detecção de contaminação por bactérias indicadoras podem ser aumentadas quando realizados testes de presença/ausência. Estudos comparativos dos métodos de presença/ausência e testes quantitativos demonstram que o primeiro método pode maximizar a detecção de colônias de coliformes totais em amostras que contêm muitos micro-organismos, pois estes podem apresentar um crescimento maior que o crescimento dos coliformes totais e causarem problemas de detecção (APHA, 2012).

Os métodos amplamente utilizados para análises microbiológicas da água como filtração por membrana, que expressa os resultados em Unidades Formadoras de Colônias (UFC), o da fermentação por tubos múltiplos, que revela a densidade bacteriana por meio do número mais provável (NMP) e do substrato cromogênico, baseado na detecção da atividade das enzimas  $\beta$ -D-galactosidase e  $\beta$ -D-glucuronidase, são os métodos recomendados pelo *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (PITKÄNEN *et al.*, 2007; APHA, 2012).

O uso do método do substrato cromogênico permite determinar simultaneamente os coliformes totais e *Escherichia coli* presentes em uma determinada amostra de água. Os coliformes totais hidrolisam o substrato Orto-

nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (ONPG), através da enzima  $\beta$ -D-galactosidase transformando-o em Ortonitrofenol, o qual apresenta coloração amarela. O resultado para *Escherichia coli* é positivo quando, além da coloração amarela, a água apresenta fluorescência azul sob luz ultravioleta, devido à ação do 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-glucoronídeo (MUG) utilizado como substrato da enzima  $\beta$ -glucoronidase, produzida pela maioria das cepas de *Escherichia coli* (COELHO, PIMENTEL E BEUX, 1998; BUCKALEW *et al.*, 2006; STANDING COMMITTEE OF ANALYSTS, 2009).

### 2.6.2 Contagem de Bactérias Heterotróficas

A contagem de bactérias heterotróficas, desenvolvida em 1881 por Robert Koch, estava entre os primeiros parâmetros utilizados para monitorar a segurança da água potável (KOOIJ, 2003). No entanto, atualmente é um indicador da qualidade geral da água nos sistemas de distribuição, pois sua presença pode indicar crescimento microbiano nos materiais dos sistemas de tratamento e de distribuição, condições inadequadas de higiene dos reservatórios, processo inadequado de tratamento da água e níveis insuficientes de resíduos sanitizantes. Pode ser utilizado também para monitorar mudanças da população bacteriana após modificações do tratamento da água, como a alteração do desinfetante utilizado (PAYMENT, SARTORY E REASONER, 2003; MARZANO E BALZARETTI, 2013).

O termo “bactérias heterotróficas” inclui todas as bactérias que utilizam nutrientes orgânicos como substrato para o seu metabolismo. Estas bactérias estão presentes em todos os tipos de água, solos, vegetação e ar (ALLEN, EDBERGB E REASONERC, 2004). Níveis elevados de bactérias heterotróficas ocorrem especialmente em locais da tubulação onde há água parada, em encanamento doméstico e filtros de água (FRANCISQUE *et al.*, 2009).

Os principais determinantes de crescimento das bactérias heterotróficas são: tipo de micro-organismos presentes, temperatura, disponibilidade de nutrientes e falta de desinfecção ou concentração insuficiente de desinfetante (FRANCISQUE *et al.*, 2009). Os micro-organismos presentes são aqueles que resistiram ao processo de desinfecção ou que tiveram acesso ao sistema de distribuição em algum ponto da planta de tratamento (PAYMENT, SARTORY E REASONER, 2003), ou seja, a



ocorrência de crescimento bacteriano depende da interação de parâmetros químicos, físicos e operacionais (LECHEVALLIER, 2003).

Como a matéria orgânica não é removida durante o tratamento da água, esta pode prover nutrientes para o desenvolvimento de bactérias heterotróficas (ROBERTSON E BROOKS, 2003). Níveis elevados de crescimento microbiano podem afetar o gosto e odor da água potável, bem como indicar a presença de nutrientes e biofilmes nos reservatórios ou tubulações. A deterioração da água potável, filtros obstruídos, bioincrustação e biocorrosão têm sido associados com bactérias heterotróficas. Desta forma, é adequado que o conteúdo microbiológico da água potável contenha um nível muito baixo destas bactérias (CHOWDHURY, 2012; MARZANO E BALZARETTI, 2013).

A Placa para Contagem de Heterotróficas (HPC) representa o isolamento destes micro-organismos que podem variar pela composição do meio do local de coleta, tempo de incubação e temperatura de incubação do meio utilizado o que permite enumerar apenas uma fração das bactérias heterotróficas do ambiente analisado. Tal fato ocorre por que a maioria dos micro-organismos, particularmente as bactérias *prosthete*, as espécies *Mycobacterium*, *Spirochaetes*, e as espécies *Thiobacillus*, são incapazes de crescer em meios de placa para contagem de heterotróficos. Para alguns, o meio é muito rico e para outros, insatisfatório (ALLEN, EDBERGB E REASONERC, 2004; PINTO, KANEKO E PINTO, 2010).

O tempo e a temperatura de incubação são variáveis muito significativas para este tipo de contagem. Uma alta temperatura de incubação (35-37°C) num curto tempo (34-48h) favorece o crescimento de bactérias oriundas de animais e humanos e pode ser um ótimo indicador de qualidade. Já uma baixa temperatura de incubação (20-28°C) com um longo tempo (5 – 7 dias), favorece o crescimento de bactérias naturais da água, com prevalência de bactérias Gram (-) que não tem significado para indicar qualidade (ENVIRONMENT AGENCY, 2002; ALLEN, EDBERGB E REASONERC, 2004; PINTO, KANEKO E PINTO, 2010). Porém, o teste em si, não especifica o tipo de micro-organismo detectado (BARTRAM *et al.*, 2004).

O número de organismos detectado pelo teste de HPC inclui organismos sensíveis aos processos de desinfecção, como coliformes totais, organismos resistentes ao processo de desinfecção, como os formadores de esporos, e organismos que se proliferam rapidamente na água tratada na ausência de resíduos

de sanitizantes. Os organismos detectados também podem variar muito dependendo do local, estação do ano e frequência de coleta de amostras do mesmo local (WHO, 2008).

Os micro-organismos detectados pelo teste HPC a 37°C são geralmente aqueles que fazem parte da microbiota natural da água e não são tipicamente patogênicos, mas podem incluir patógenos oportunistas como *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Moraxella*, *Serratia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*, que podem encontrar condições favoráveis para crescerem nestes sistemas, visto que os micro-organismos heterotróficos habitam locais com restos de matéria orgânica (BARTRAM *et al.*, 2004; WHO, 2008; SILVA *et al.*, 2008). Também há patógenos oportunistas, como a *Legionella*, que se desenvolvem com menos frequência na água e que não são detectados pela Contagem de Bactérias Heterotróficas (BARTRAM *et al.*, 2003). Contudo, não há evidências clínicas e epidemiológicas suficientes para concluir que uma alta contagem de HPC represente um risco para saúde de pessoas saudáveis. No entanto, podem causar problemas de saúde em indivíduos com imunidade comprometida (FALCONE-DIAS E FARACHE FILHO, 2013).

Alguns processos de tratamento de água potável, como a coagulação e a sedimentação, reduzem o número de HPC na água, mas eles podem se proliferar em outros processos de filtração, como carvão ativado e filtros de areia. As práticas de desinfecção como a cloração, utilização de ozônio e luz ultravioleta, reduzem significativamente as contagens de HPC, no entanto, nenhum processo de desinfecção esteriliza a água (WHO, 2008).

Os regulamentos para água potável na Alemanha, Japão e Austrália permitem uma contagem de bactérias heterotróficas de até 100 UFC/mL de água (CHOWDHURY, 2012). Nos Estados Unidos, Canadá e Brasil o limite de 500 UFC/mL é utilizado como critério de monitoramento (FRANCISQUE *et al.*, 2009; BRASIL, 2011).

Como observado, a qualidade da água está relacionada com o grau de contaminação bacteriana, e a HPC é uma ferramenta importante para monitorar a eficiência do processo de tratamento de água e avaliar as alterações na qualidade da água durante a distribuição, assim como, a limpeza das caixas d'água e reservatório dos bebedouros e a periodicidade da troca dos elementos filtrantes.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo observacional transversal realizado no período de abril a outubro de 2013, no qual foi avaliada a qualidade das práticas de higiene em três restaurantes da Universidade pública, codificados como restaurante “A”, “B” e “C”, mediante análise microbiológica das superfícies de contato com alimentos, das mãos dos manipuladores de alimentos e da água filtrada para consumo e água de torneira utilizada no preparo dos alimentos.

#### 3.1 SUPERFÍCIE DE CONTATO COM ALIMENTOS

##### 3.1.1 Coleta das amostras

A coleta das amostras foi realizada pela manhã, antes do início das atividades de pré-preparo e preparo das frutas e vegetais nos três restaurantes universitários avaliados. Foi solicitado aos funcionários responsáveis que executassem o procedimento de higienização regular, de acordo com a rotina estabelecida em cada restaurante.

##### 3.1.2 Método convencional para análise de superfícies de contato com alimentos

Foram avaliadas oito superfícies de contato com alimentos em cada restaurante, totalizando 24 superfícies, selecionadas de forma aleatória, por meio do método de contato por “Swab” descrito pela *American Public Health Association* (APHA) (2001). Foi utilizado o Kit *swab-rinse* (SRK) da marca Copan®, tipo *Rayon* com 14,6cm e 10mL de solução salina balanceada de *Ringers*, Polissorbato 80, Lecitina, Tiosulfato de sódio, Tioglicolato de sódio, Bissulfito de sódio, Piruvato de sódio e Hexametáfosfato de sódio com auxílio de um delimitador de área estéril de 10 x 10cm<sup>2</sup>.

Foi delimitada uma área de 200cm<sup>2</sup>, coletada uma única vez em duas áreas distintas de 100cm<sup>2</sup> de cada superfície (FIGURA 2). As amostras foram coletadas em dias diferentes em cada restaurante, porém, as amostras das oito superfícies de

cada restaurante foram coletadas no mesmo dia. As superfícies analisadas são apresentadas no QUADRO 1.

QUADRO 1 – SUPERFÍCIES DE CONTATO COM ALIMENTOS ANALISADAS NOS RESTAURANTES UNIVERSITÁRIOS

SUPERFÍCIE 1	Cuba de lavagem e enxágue de frutas e vegetais clorados
SUPERFÍCIE 2	Bancadas para processamento de frutas e vegetais
SUPERFÍCIE 3	Tábuas de corte para processamento de frutas e vegetais
SUPERFÍCIE 4	Caixas plásticas de armazenamento de frutas e vegetais higienizados e processados
SUPERFÍCIE 5	Picador manual de frutas e vegetais
SUPERFÍCIE 6	Cubas de servimento de frutas e vegetais prontos para consumo
SUPERFÍCIE 7	Processador de vegetais
SUPERFÍCIE 8	Bandejas de inox com divisórias utilizadas pelos comensais



FIGURA 2 - COLETA DAS AMOSTRAS COM SWAB E DELIMITADOR DE 100CM² EM SUPERFÍCIE DE CONTATO COM ALIMENTOS

Optou-se pela verificação da eficácia das práticas de higiene das áreas de processamento de frutas e vegetais prontos para consumo devido estes alimentos não passarem por nenhum tratamento térmico posterior ao contato com estas superfícies. Entendendo, desta forma, que a sobrevivência e crescimento de micro-organismos por uma higiene incorreta pode conduzir à contaminação do produto final e resultar num risco elevado de DTA.

O material coletado foi armazenado e transportado em caixa térmica com bolsa de gelo para o Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia Básica do Setor de Ciências Biológicas - Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná.

### 3.1.3 Plaqueamento seletivo diferencial

O material foi analisado no mesmo dia pelo método de plaqueamento em superfície (*Spread Plate*) descrito pela APHA (2001) com meios de cultura específicos em placas de Petri de 90x15mm descritos no QUADRO 2 e seguindo o fluxograma apresentado na FIGURA 3. As amostras foram homogeneizadas e inoculadas em triplicata nas placas com auxílio de um pipetador com capacidade para 0,1mL, o volume espalhado nas placas com auxílio da alça de Drigalski estéril e posteriormente incubadas em estufa bacteriológica a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 48 horas.

QUADRO 2 – MICRO-ORGANISMOS ANALISADOS E MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DAS PRÁTICAS DE HIGIENE DAS SUPERFÍCIES DE CONTATO COM ALIMENTOS

MICRO-ORGANISMOS ANALISADOS	MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS
Contagem total de bactérias	<i>Microbial Content Test Agar</i> – MCTA (Laborclin®)
Coliformes totais e <i>Escherichia coli</i>	Ágar ECC cromogênico (Laborclin®)
<i>Enterococcus</i> sp	Ágar Azida com sangue (Laborclin®)
<i>Staphylococcus</i> sp	Ágar Sal Manitol (Laborclin®)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ágar Cetrimide (Laborclin®)

FONTE: LABORCLIN, 2013

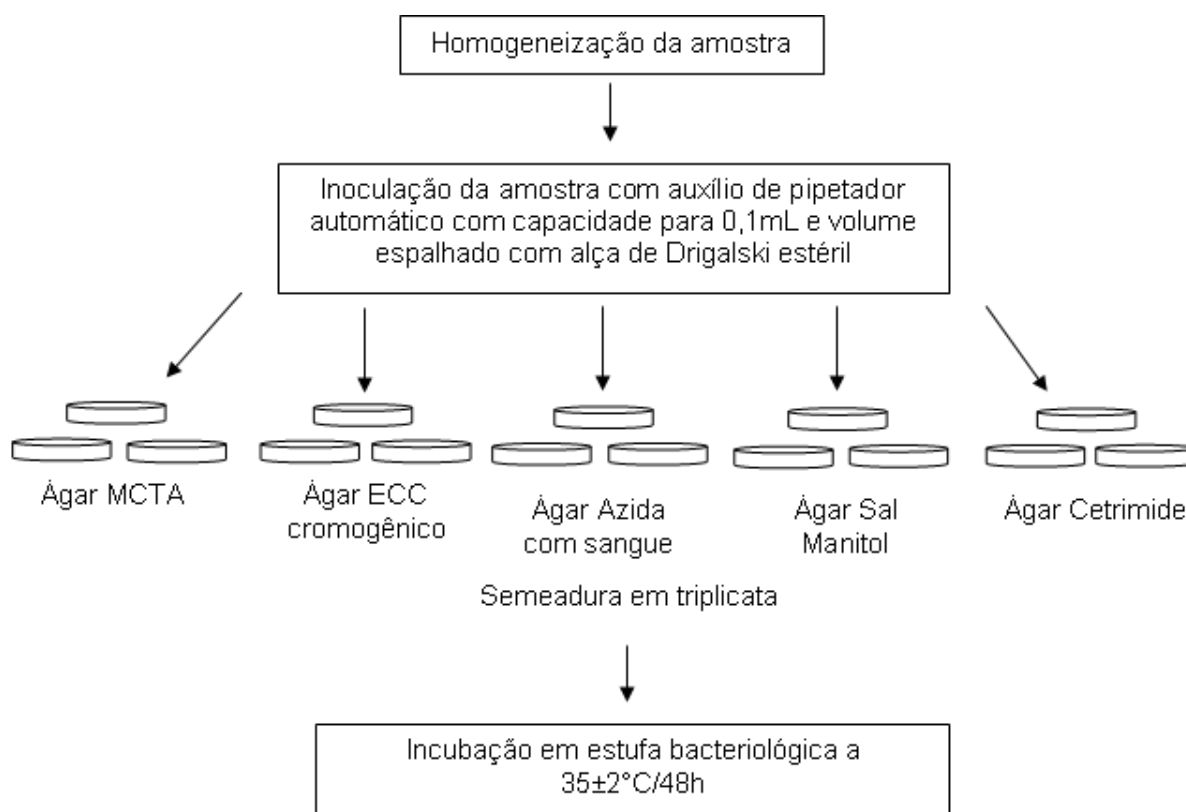


FIGURA 3 - FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DO MÉTODO DE PLAQUEAMENTO EM SUPERFÍCIE

### 3.1.4 Enumeração das colônias

As colônias foram enumeradas visualmente e os resultados foram expressos em  $\log_{10}$  UFC/200cm<sup>2</sup> e comparados com os valores apresentados pelo Órgão Oficial Internacional *American Public Health Association* (APHA, 2001), adaptados para  $\log_{10}$  UFC/200cm<sup>2</sup> (QUADRO 3).

QUADRO 3 - ESPECIFICAÇÕES MICROBIOLÓGICAS RECOMENDADAS PELA APHA (2001) PARA SUPERFÍCIES DE CONTATO COM ALIMENTOS

Micro-organismos	APHA (2001)
Contagem Total de Bactérias	<2,3 $\log_{10}$ UFC/200cm <sup>2</sup>
Coliformes totais e <i>E. coli</i>	<2,3 $\log_{10}$ UFC/200cm <sup>2</sup>
<i>Enterococcus</i> sp	<2,3 $\log_{10}$ UFC/200cm <sup>2</sup>
<i>Staphylococcus</i> sp	<2,3 $\log_{10}$ UFC/200cm <sup>2</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<2,3 $\log_{10}$ UFC/200cm <sup>2</sup>

### 3.1.5 Confirmação das colônias típicas e identificação bioquímica

#### 3.1.5.1 Ágar ECC cromogênico

As colônias com coloração azul ou róseas do meio de cultura de coliformes totais e *E. coli* (ECC cromogênico - Laborclin®) foram isoladas em meio de cultura Ágar Cled (Laborclin®) para verificação da fermentação da lactose. Na sequência foram semeadas em meio nutritivo (Laborclin®) para obtenção de colônias de 24h e posteriormente testadas quanto à oxidase através de tiras de oxidase (Laborclin®), seguindo orientação do fabricante. Após o teste da oxidase, as colônias foram identificadas pelo Sistema de identificação bioquímica para bacilos Gram-negativos oxidase negativos, BACTRAY I e II e oxidase positivos, BACTRAY III (Laborclin®). As etapas destas identificações estão descritas no fluxograma apresentado na FIGURA 4.

Os sistemas de identificação BACTRAY I e II apresentam as seguintes provas bioquímicas: ONPG (o-nitrofenol-beta-d-galacto-piranoside); ADH (Arginina dehidrolase); LDC (Lisina descarboxilase); ODC (Ornitina descarboxilase); H<sub>2</sub>S (sulfeto de hidrogênio); URE (urease); VP (Voges Proskauer); PD (Desaminação da L-fenilalanina); IND (Indol); CIT (citrato de sódio); Malonato; Rhamnose; Adonitol; Salicina; Arabinose; Inositol; Sorbitol; Sacarose; Manitol e Rafinose.

O Sistema de identificação BACTRAY III apresenta as seguintes provas bioquímicas: Cetrímide; Acetamina; Malonato; Citrato; Maltose; Esculina; L-arginina; Uréia e Indol.

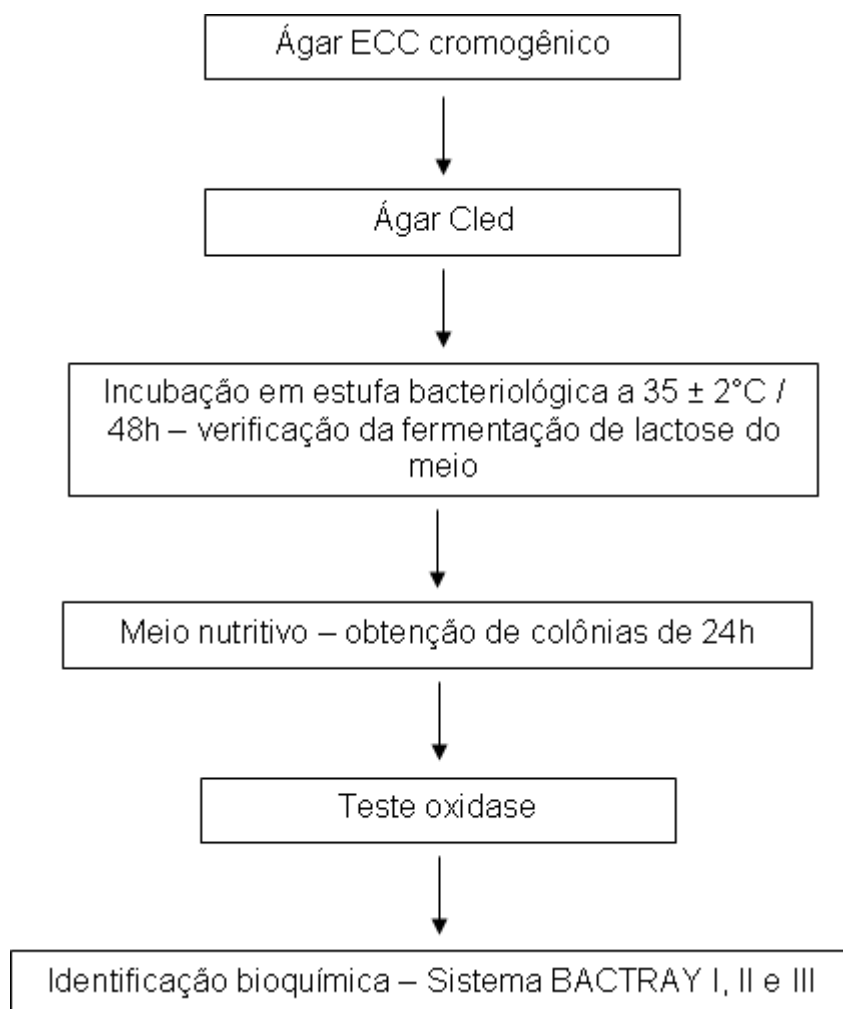


FIGURA 4 - FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DE IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DAS COLÔNIAS DO MEIO E CULTURA ECC CROMOGÊNICO

### 3.1.5.2 Ágar Azida com sangue

Foi verificado se houve o crescimento de colônias com formação de hemólise no ágar Azida com sangue. Como o Ágar Azida com sangue já é um meio seletivo diferencial para *Enterococcus*, não foi realizada a confirmação bioquímica das colônias.

### 3.1.5.3 Ágar Sal Manitol

As colônias de cor amarela com crescimento no meio Sal Manitol foram isoladas em meio nutritivo (Laborclin®) para obtenção de colônias de 24 horas e realização do teste da coagulase pelo método rápido de aglutinação com látex – Staphclin látex® (Laborclin®) que permite a identificação após 45 segundos de reação. O método foi realizado de acordo com a orientação do fabricante após os reagentes adquirirem temperatura ambiente.

Os resultados foram interpretados segundo a descrição abaixo:

- Suspensão opaca homogênea: ausência de aglutinação = teste negativo.
- Suspensão opaca contendo alguns grumos em quantidade de pouco a moderada = teste negativo.
- Suspensão límpida com grumos grandes e bem visíveis = teste positivo.

Os testes coagulase positivos pela aglutinação do látex foram confirmados pelo teste de coagulase em tubo através de plasma de coelho liofilizado com EDTA - Coagu-plasma® (Laborclin®), seguindo método descrito por Silva *et al.* (2010).

### 3.1.5.4 Ágar Cetrimide

As colônias amarelo-esverdeadas a azuis com crescimento do ágar Cetrimide foram identificadas pelo Sistema de identificação BACTRAY III descrito no item 3.1.5.1.

### 3.1.6 Análise estatística

Para este estudo, amostras negativas foram definidas como as que tiveram contagem  $< 2 \log_{10}$  UFC/200cm<sup>2</sup>. Os dados foram categorizados como satisfatórios ( $< 2,3 \log_{10}$  UFC/200cm<sup>2</sup>) e insatisfatórios ( $> 2,3 \log_{10}$  UFC/200cm<sup>2</sup>) de acordo com as especificações microbiológicas. Estatística descritiva foi calculada para todas as variáveis e teste exato de Fisher para verificação da associação entre os restaurantes e as variáveis contagem total de bactérias, coliformes totais,



*Enterococcus* sp, *Staphylococcus* sp e *Pseudomonas aeruginosa*. As análises foram realizadas por meio do Software R Project, versão 3.0.2 (R CORE TEAM, 2013).

### 3.2 MANIPULADORES DE ALIMENTOS

#### 3.2.1 Coleta das amostras

Foi avaliada a qualidade microbiológica das mãos de 81 manipuladores de alimentos - 27 em cada restaurante universitário - entre cozinheiros, auxiliares e açougueiros, homens e mulheres, dos dois turnos de trabalho dos restaurantes. As amostras foram coletadas em dias diferentes em cada restaurante, porém as amostras dos 27 manipuladores foram coletadas no mesmo dia.

Os manipuladores de alimentos dos restaurantes universitários em estudo recebem treinamento periódico a cada seis meses sobre BPM que aborda os seguintes temas: cuidados básicos higiênicos na manipulação de alimentos, higiene pessoal e cuidados com o uniforme, qualidade da matéria prima, noções de microbiologia de alimentos, produtos de higiene para a área de alimentos, higiene do local, equipamentos e utensílios e legislação. Desta forma, não foi realizado nenhum tipo de treinamento pela autora anteriormente à avaliação das mãos destes manipuladores.

A prática foi explicada aos manipuladores de cada restaurante e, após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE 1) (Parecer Comitê de Ética em Pesquisa nº 212.488), foi solicitado para cada manipulador lavar e realizar a antissepsia das mãos de acordo com o procedimentos estipulados e padronizados pelos restaurantes.

#### 3.2.2 Método utilizado para coleta das amostras

As amostras foram coletadas pelo método de *imprint* ou decalque com os laminocultivos (FIGURA 7) descritos no QUADRO 4, seguindo a orientação do fabricante - Laborclin®. O tempo de decalque estipulado para cada amostra foi de cinco segundos de contato do meio de cultura com a mão. As amostras foram

coletadas em triplicata. Todas as etapas utilizadas na avaliação das mãos dos manipuladores estão apresentadas na forma de fluxograma na FIGURA 5.

QUADRO 4 - MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS PARA AVALIAÇÃO DAS MÃOS DOS MANIPULADORES

<b>Microrganismos analisados</b>	<b>Meios de cultura</b>
<i>Staphylococcus</i> sp	Laminocultivo (Hygiene test Contact-Slide) Nutrilab® S - Ágar Sal Manitol
Coliformes totais	Laminocultivo (Hygiene test Contact-Slide) Nutrilab E® - Ágar Violeta Vermelho Bile (VRBA)
Contagem total de bactérias	Laminocultivo (Hygiene test Contact-Slide) Nutrilab E® - Ágar de contagem em placa (PCA)

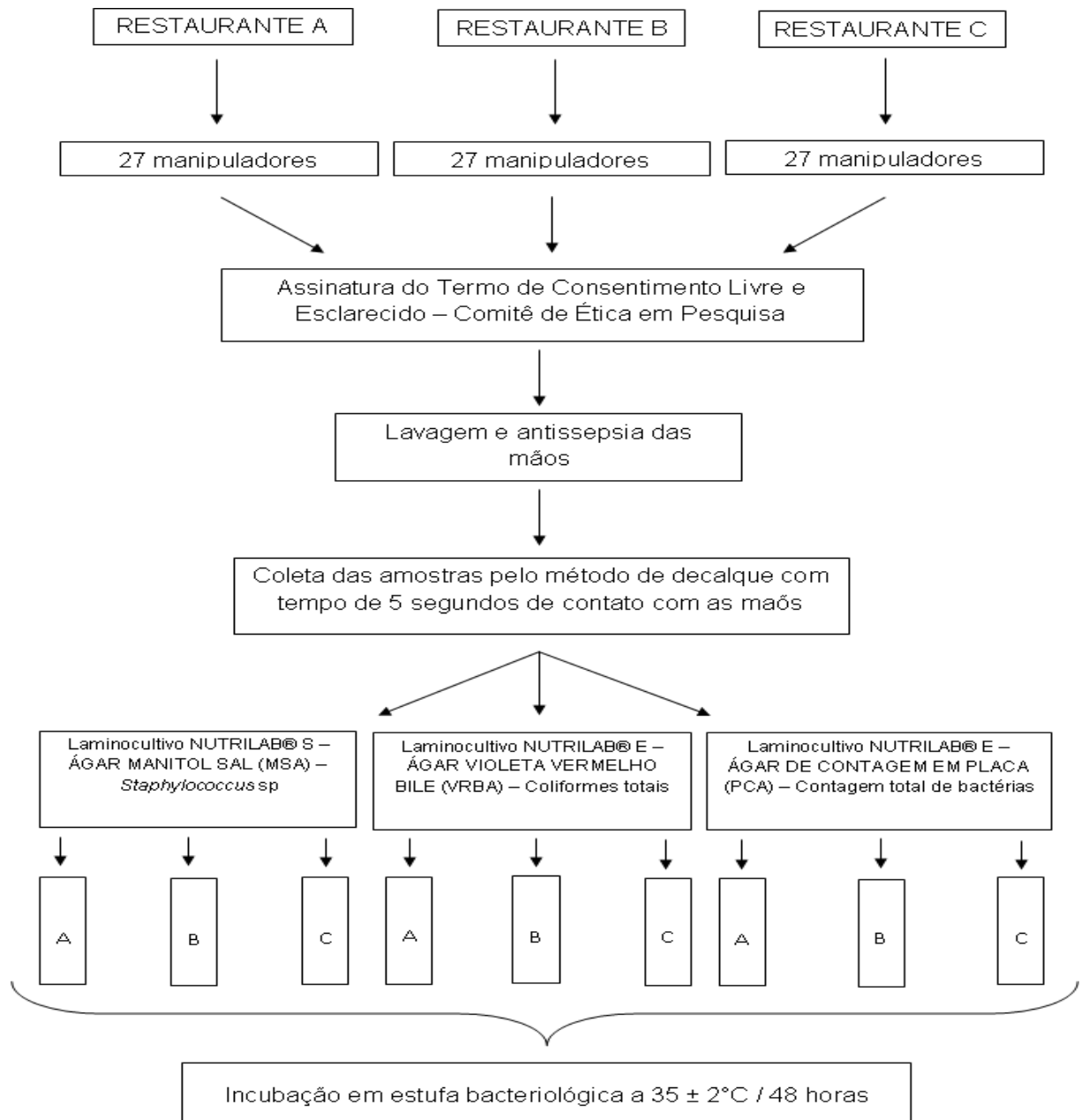


FIGURA 5 - FLUXOGRAMA DA COLETA DAS AMOSTRAS EM MÃOS DE MANIPULADORES DE ALIMENTOS DOS RESTAURANTES UNIVERSITÁRIOS

Os laminocultivos foram abertos somente no momento do uso, sendo a coleta realizada com o uso de luvas. Os laminocultivos foram pressionados sobre as mãos dos manipuladores e as amostras foram coletadas em triplicata em regiões diferentes das duas mãos dos manipuladores seguindo esquema da FIGURA 6.

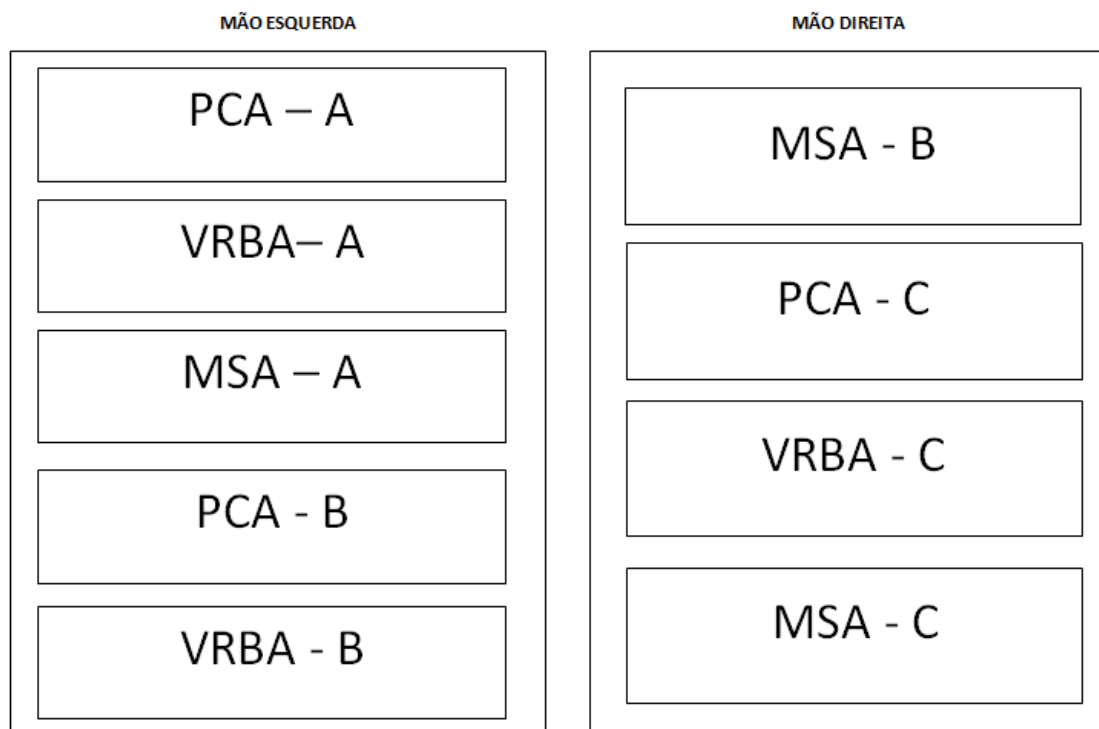


FIGURA 6 - ESQUEMA UTILIZADO PARA COLETA DAS AMOSTRAS DE MÃOS DE MANIPULADORES

PCA: Ágar padrão de contagem; VRBA: Ágar violeta vermelho bile; MSA: Ágar manitol sal. A/B/C: Triplicata das amostras.

Após a coleta, os laminocultivos foram transportados, em caixas térmicas, para o Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia Básica do Setor de Ciências Biológicas - Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, e incubados em estufa bacteriológica a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 48 horas.

### 3.2.3 Especificações microbiológicas utilizadas para avaliação dos resultados

Os resultados obtidos nos Laminocultivos foram expressos em  $\log_{10}$  UFC/8,5cm<sup>2</sup> de superfície (relativo à área do laminocultivo). A legislação brasileira não apresentar especificações para contagem de micro-organismos em mãos de manipuladores, assim, os valores obtidos foram comparados com especificações

microbiológicas apresentadas por Marzano e Balzaretto (2011), adaptadas para  $\log_{10}$  UFC/8,5cm<sup>2</sup> (QUADRO 5).

QUADRO 5 - ESPECIFICAÇÕES MICROBIOLÓGICAS APRESENTADAS POR MARZANO E BALZARETTI (2011)

<b>Microorganismos</b>	<b>Marzano e Balzaretto (2011)</b>
Contagem total de bactérias	<2,23 $\log_{10}$ UFC/8,5cm <sup>2</sup>
Coliformes totais	<1,93 $\log_{10}$ UFC/8,5cm <sup>2</sup>
<i>Staphylococcus</i> coagulase positivo	<1,93 $\log_{10}$ UFC/8,5cm <sup>2</sup>

Os parâmetros de *Staphylococcus* coagulase positivo foram considerados para os resultados de *Staphylococcus* sp por não serem encontradas referências para este parâmetro em específico. A contagem foi realizada como *Staphylococcus* sp devido a dificuldade de isolamento das colônias características de *Staphylococcus* coagulase positivo no método de decalque em laminocultivo.



FIGURA 7 - COLETA DAS AMOSTRAS DAS MÃOS DE MANIPULADORES PELO MÉTODO DO DECALQUE COM LAMINOCULTIVOS

#### 3.2.4 Confirmação das colônias típicas e identificação bioquímica - Bacilos Gram-negativos

As colônias foram contadas visualmente. As Unidades Formadoras de Colônias (UFC) com crescimento no meio VRBA foram isoladas no meio Ágar Cled (Laborclin®) para verificação da fermentação da lactose. Em seguida foram semeadas em meio nutritivo (Laborclin®) para obtenção de colônias de 24 horas e posteriormente testadas quanto à oxidase através de tiras de oxidase (Laborclin®), seguindo orientação do fabricante. Após o teste da oxidase, as colônias foram identificadas pelo Sistema de identificação bioquímica para Bacilos Gram-negativos

oxidase negativos, BACTRAY I e II e oxidase positivos, BACTRAY III (Laborclin®), seguindo orientação do fabricante.

### 3.2.5 Confirmação das colônias típicas e identificação bioquímica - *Staphylococcus* sp

Todas as etapas da identificação bioquímica estão apresentadas no fluxograma apresentado na FIGURA 9. As UFC de coloração amarela com crescimento no meio Sal Manitol foram isoladas em placas de Petri com meio de cultura Sal Manitol. Como o laminocultivo apresenta uma área pequena, foi necessário o isolamento para melhor observação da degradação do manitol em placas de Petri devido às colônias terem crescido muito próximas umas das outras, o que pode mascarar a degradação por cepas não fermentativas.

As colônias foram então isoladas em meio nutritivo (Laborclin®) para obtenção de colônias de 24 horas e realização do teste da coagulase pelo método rápido de aglutinação com látex – Staphclin látex® (Laborclin®) que permite a identificação após 45 segundos de reação. O método foi realizado de acordo com a orientação do fabricante.

Os resultados foram interpretados segundo a descrição abaixo:

- Suspensão opaca homogênea: ausência de aglutinação = teste negativo.
- Suspensão opaca contendo alguns grumos em quantidade de pouco a moderada = teste negativo.
- Suspensão límpida com grumos grandes e bem visíveis = teste positivo.

Os testes coagulase positivos pela aglutinação do látex foram confirmados pelo teste de coagulase em tubo através de plasma de coelho liofilizado com EDTA - Coagu-plasma® (Laborclin®), seguindo método descrito por Silva *et al.* (2010) (FIGURA 8).

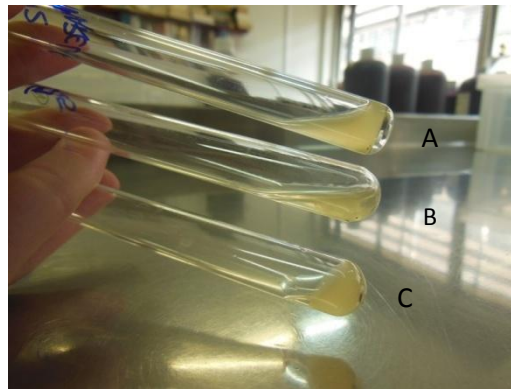


FIGURA 8 - FORMAÇÃO DO COÁGULO FIRME (TUBO "C") PELO TESTE DE COAGULASE EM TUBO COM PLASMA DE COELHO LIOFILIZADO COM EDTA

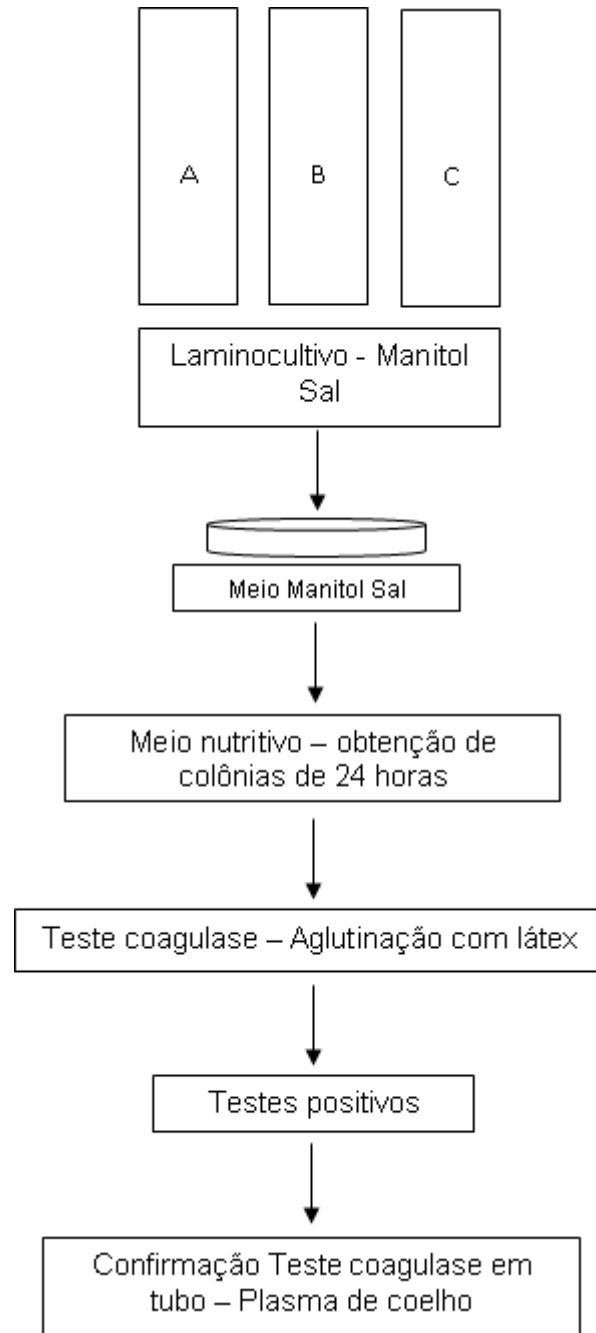


FIGURA 9 - FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DE IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA *Staphylococcus* sp



### 3.2.6 Análise estatística

Para determinação do tamanho amostral mínimo de uma população finita de 184 manipuladores de alimentos dos três restaurantes universitários, utilizou-se como amostra de conveniência 35 pessoas, com estimativa de variância de 1,5, nível de significância de 0,05 e erro casual de 20% para chegar a um tamanho amostral de 81 manipuladores que, divididos por três restaurantes, definiu-se o tamanho amostral de 27 manipuladores por restaurante. O tamanho amostral foi calculado através do pacote de estatística para microcomputadores *Statistica* 10.0 (StatSoft).

Para este estudo, amostras negativas foram definidas como as que tiveram contagem  $<0,3 \log_{10}$  UFC/8,5cm<sup>2</sup>. Estatística descritiva foi calculada para todas as variáveis. Os resultados foram categorizados em satisfatório e insatisfatório conforme descrito no QUADRO 6. Para comparação entre os restaurantes nos critérios Contagem Total de Bactérias e *Staphylococcus* sp foi realizada análise da variância (ANOVA) com *post-hoc* de Tukey com  $p < 0,05$ . Todas as análises foram calculadas por meio do Software R Project, versão 3.0.2 (R CORE TEAM, 2013).

QUADRO 6 - CATEGORIZAÇÃO DOS RESULTADOS DAS AMOSTRAS DAS MÃOS DOS MANIPULADORES DE ALIMENTOS

Contagens	Satisfatório	Insatisfatório
Contagem total de bactérias	$<2,23 \log_{10}$ UFC/8,5cm <sup>2</sup>	$>2,23 \log_{10}$ UFC/8,5cm <sup>2</sup>
Coliformes totais	$<1,93 \log_{10}$ UFC/8,5cm <sup>2</sup>	$>1,93 \log_{10}$ UFC/8,5cm <sup>2</sup>
<i>Staphylococcus</i> coagulase positivo	$<1,93 \log_{10}$ UFC/8,5cm <sup>2</sup>	$>1,93 \log_{10}$ UFC/8,5cm <sup>2</sup>

### 3.3 ÁGUA FILTRADA E ÁGUA DE TORNEIRA

Para análise da água dos restaurantes universitários foi delimitado para cada restaurante um ponto de água filtrada para consumo (bebedouros) e um ponto de água de torneira utilizada para enxágue das frutas e vegetais clorados, servidos nas refeições, num total de seis amostras.

O ponto de água para consumo foi amostrado de bebedouros de pressão em inox com sistema de boia e capacidade de 150 a 180L de água refrigerada, com filtro de carbono ativado com eficiência de redução de partículas de 3 a 50 micras.

As amostras foram coletadas no período da tarde. A área interna e externa das torneiras foi higienizada com álcool 70% e as torneiras de metal (ponto de água para enxágue das frutas e vegetais clorados) foram flambadas. Deixou-se a água fluir por aproximadamente 2 minutos para limpeza das tubulações, conforme método elucidado por Silva *et al.* (2010) e APHA (2012).

As amostras foram coletadas em frascos estéreis com capacidade para 100mL com tiosulfato de sódio (10mg) para neutralizar resíduos de cloro. Os frascos foram transportados imediatamente, em caixas térmicas com gelo, para o Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia Básica da UFPR. As amostras foram avaliadas em relação a Coliformes totais, *Escherichia coli* e contagem de bactérias heterotróficas. A análise para heterotróficas foi realizada em quadruplicata.

### 3.3.1 Pesquisa de Coliformes totais e *Escherichia coli*

Para pesquisa de Coliformes totais e *Escherichia coli* foi utilizado o método de Presença/Ausência pelo substrato cromogênico - Aquateste Coli® (Laborclin®) de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* - APHA (2012).

O Aquateste Coli é um meio em pó, composto pelos nutrientes orto-nitrofenol-beta-galacto-piranosideo (ONPG) e methyl-umbelipheril-glucuronide (MUG) apresentado em frascos para diluir 100ml de amostra. A sensibilidade da metodologia para *E. coli* é a partir de 1 UFC/mL de amostra (LABORCLIN, 2009).

O ONPG quando hidrolisado pela beta-galactosidade dos coliformes totais, desenvolve coloração amarela. A *E. coli* é diferenciada pela presença do MUG que, quando degradado pela enzima beta-glucoronidase produzida por este micro-organismo, produz fluorescência quando em exposição à luz ultravioleta (LABORCLIN, 2009).

O método foi realizado de acordo com as informações técnicas do fabricante, como apresentado e FIGURA 10:

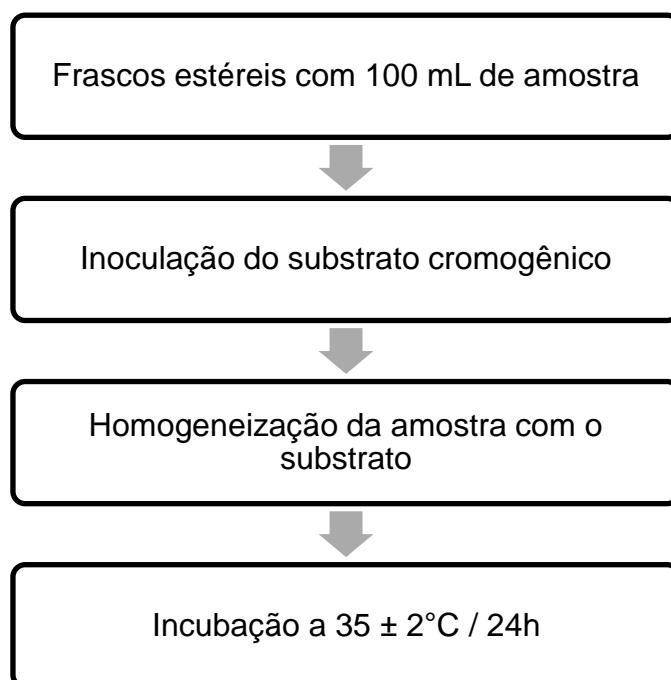


FIGURA 10 - PROCEDIMENTO PARA ANÁLISE DE COLIFORMES TOTAIS E *Escherichia coli* PELO MÉTODO DO SUBSTRATO CROMOGÊNICO

FONTE: LABORCLIN, 2009

### 3.3.2 Contagem de Bactérias Heterotróficas a 37°C

A análise de bactérias heterotróficas a 37°C foi realizada pelo método de semeadura em superfície descrito pela APHA (2012) com o Laminocultivo Aquacult® (Laborclin®) com meio *Plate Count Agar* (PCA) com cloreto de Trifenil-tetrazólio (TTC) (FIGURA 11).



FIGURA 11 - ANÁLISE DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS A 37°C PELO MÉTODO DE SEMEADURA EM SUPERFÍCIE ADAPTADO AO LAMINOCULTIVO AQUACULT® - LABORCLIN®

O meio que compõe o Aquacult®, o *Plate Count Agar* com TTC, propicia o desenvolvimento de um número variado de bactérias e de alguns fungos e leveduras. A incorporação do TTC visa permitir uma melhor visualização do crescimento, visto que as colônias se coram em vermelho. Cada vial do laminocultivo absorve 0,5ml de líquido em cada lado. O Aquacult® permite avaliar o crescimento de micro-organismos na faixa situada entre  $10^2$  a  $10^6$  UFC/ML de amostra líquida analisada (LABORCLIN, 2010).

O método foi realizado de acordo com as informações técnicas do fabricante, conforme FIGURA 12:

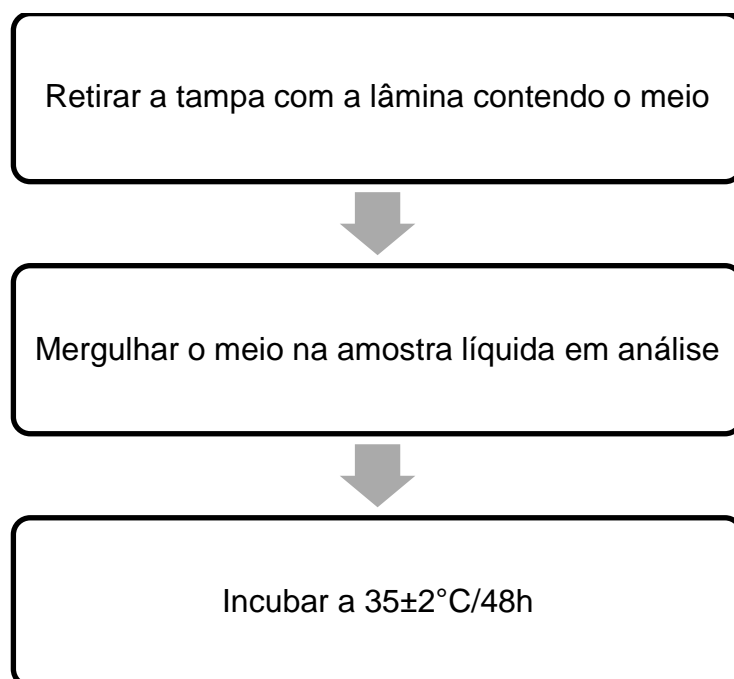


FIGURA 12 - PROCEDIMENTO PARA CONTAGEM DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS A 37°C PELO MÉTODO DE SEMEADURA EM SUPERFÍCIE ADAPTADO PARA LAMINOCULTIVOS

FONTE: LABORCLIN, 2010

Observou-se o crescimento de colônias de cor vermelha e este foi comparado por aproximação visual com o gabarito de leitura (FIGURA 13) para estimar o resultado em UFC/mL.

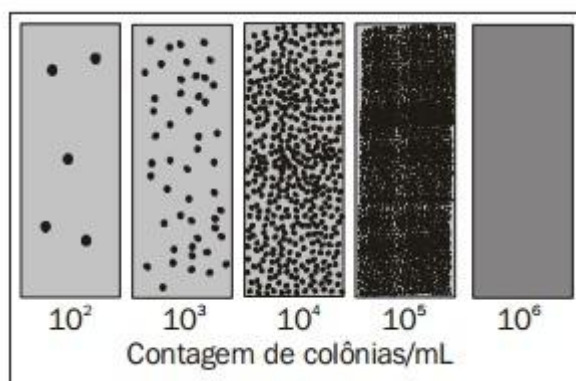


FIGURA 13 - GABARITO DE LEITURA AQUACULT® (LABORCLIN®)  
 FONTE: LABORCLIN, 2010

Os resultados foram comparados com os parâmetros da Portaria nº 2.914 de 12 de dezembro de 2011 do Ministério da Saúde (QUADRO 7).

QUADRO 7 - PADRÕES MICROBIOLÓGICOS PARA ÁGUA POTÁVEL ESTABELECIDOS PELA PORTARIA Nº 2.914 DE 12 DE DEZEMBRO DE 2011 DO MINISTÉRIO DA SAÚDE

Contagem de bactérias heterotróficas	Não ultrapassar 500 UFC/mL de amostra
<i>Escherichia coli</i> e coliformes totais	Ausentes em 100 mL

### 3.3.3 Análise estatística

As médias dos resultados foram realizadas para todas as variáveis por meio do Software R Project, versão 3.0.2 (R CORE TEAM, 2013).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 SUPERFÍCIE DE CONTATO COM ALIMENTOS

As porcentagens de superfícies de contato avaliadas nos três restaurantes universitários com resultados insatisfatório em comparação com as especificações da APHA (2001) estão apresentadas na TABELA 1. Não foi possível realizar o teste exato de Fisher para as variáveis coliformes totais, *Enterococcus* sp, *Staphylococcus* sp e *Pseudomonas aeruginosa* devido ao número de amostras com contagens  $<2 \log_{10}$  UFC/200cm<sup>2</sup>.

TABELA 1 – PORCENTAGEM DAS SUPERFÍCIES DE CONTATO COM ALIMENTOS COM RESULTADOS INSATISFATÓRIOS AOS LIMITES ESPECIFICADOS PELA APHA (2001)

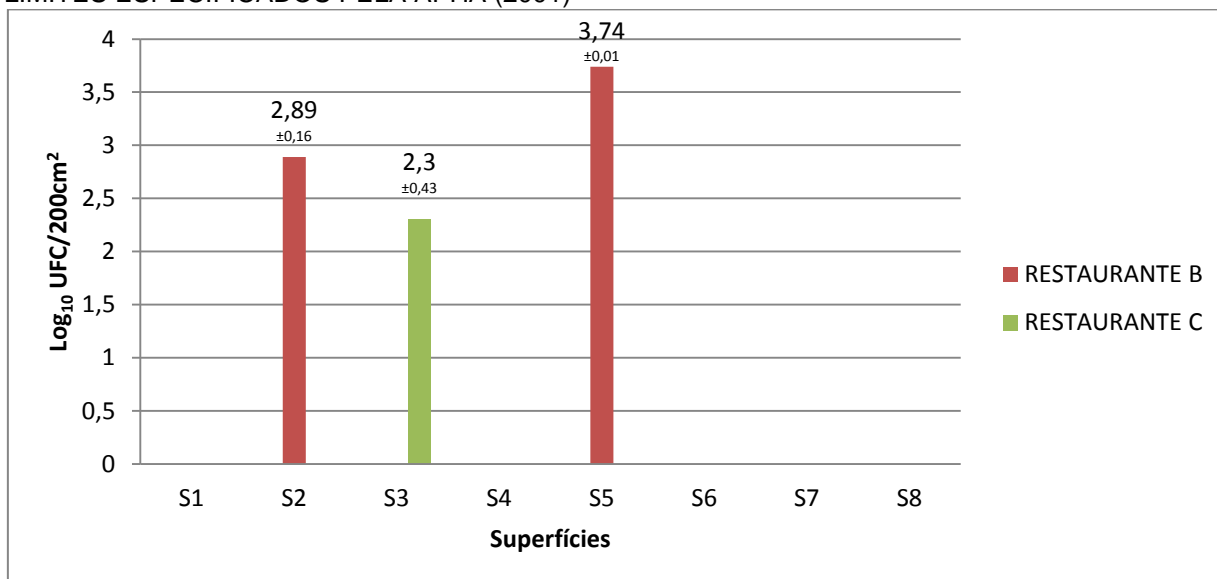
APHA (2001)									
Resultados insatisfatórios = $>2,3 \log_{10}$ UFC/200cm <sup>2</sup>									
RESTAURANTES	CT		S		EN		PA		CTB
	(n)	%	(n)	%	(n)	%	(n)	%	(n) %
A (n = 8)	0	0	0	0	0	0	0	0	4 50
B (n = 8)	2	25	1	12,5	0	0	0	0	4 50
C (n = 8)	1	12,5	1	12,5	0	0	0	0	5 62,5
TOTAL (n = 24)	3	12,5	2	8,3	0	0	0	0	13 54,2

CT: coliformes totais; S: *Staphylococcus* sp.; EN: *Enterococcus* sp; PA: *Pseudomonas aeruginosa*; CTB: Contagem total de bactérias  
UFC: Unidades Formadoras de Colônias

#### 4.1.1 Coliformes Totais

Das 24 superfícies avaliadas, três apresentaram resultados insatisfatórios aos limites especificados pela APHA (2001) para coliformes totais. Todas as superfícies do restaurante “A” apresentaram resultados satisfatórios às especificações da APHA. No entanto, o restaurante “B” e o restaurante “C” apresentaram duas (n=2) e uma (n=1) superfície, respectivamente, com resultados insatisfatórios para este critério. Silva Jr. (2005) considera como satisfatório a ausência de coliformes termotolerantes em superfícies de contato com alimentos, pois são facilmente eliminados por uma higienização eficaz. Desta forma, assim como os coliformes termotolerantes, os coliformes totais também são facilmente eliminados por uma higienização eficaz. Falhas na higienização destas superfícies podem colaborar para presença de micro-organismos patogênicos e risco de DTA.

GRÁFICO 1 – CONTAGEM DE COLIFORMES TOTAIS DAS SUPERFÍCIES DOS RESTAURANTES UNIVERSITÁRIOS, CUJOS RESULTADOS SE APRESENTARAM INSATISFATÓRIOS AOS LIMITES ESPECIFICADOS PELA APHA (2001)



UFC: Unidade Formadora de Colônia

S1: Cuba de lavagem e enxágue de frutas e vegetais clorados; S2: Bancadas para processamento de frutas e vegetais; S3: Tábuas de corte para processamento de frutas e vegetais; S4: Caixas plásticas de armazenamento de frutas e vegetais higienizados e processados; S5: Picador manual de frutas e vegetais; S6: Cubas de servimento de frutas e vegetais prontos para consumo; S7: Processador de vegetais; S8: Bandejas de inox com divisórias utilizadas pelos comensais

A superfície que revelou os maiores valores de Coliformes totais foi o picador manual de frutas e vegetais ( $3,74 \log_{10}$  UFC/200cm<sup>2</sup>) do restaurante “B”. Os micro-organismos identificados nas superfícies com contagem positiva foram: *Serratia fonticola*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* e *Rahnella aquatilis*. Não foi encontrado *E. coli* em nenhuma das amostras analisadas.

Estes micro-organismos, com exceção da *Rahnella aquatilis*, pertencem à tribo *Klebsiellae* da família das *Enterobacteriaceae*, de acordo com o conceito de Ewing<sup>1</sup> (1986 citado por WINN Jr. *et al.*, 2010). São gêneros que compartilham de reações bioquímicas e importância diagnóstica semelhantes. A *Klebsiella pneumoniae* pode causar uma forma clássica de pneumonia primária e de infecções pulmonares, além de uma variedade de infecções extrapulmonares, como infecções do trato urinário. A *Enterobacter aerogenes* distribui-se na água, esgotos, solo e vegetais e está associada a infecções oportunistas que acometem o trato urinário, vias respiratórias e feridas cutâneas. A *Serratia fonticola* é um micro-organismo aquático, assim como a *Rahnella aquatilis*, esta última isolada de vegetais (WINN Jr. *et al.*, 2010). A presença destes micro-organismos não representa um perigo de transmissão de doenças pelos alimentos, porém caracteriza falha na limpeza e

<sup>1</sup> EWING W. H. Identification of *enterobacteriaceae*. 4<sup>th</sup> ed. New York: Elsevier.1986.

desinfecção das superfícies, o que pode ser considerado um risco da presença de patógenos, visto que o ambiente favorece o desenvolvimento de micro-organismos.

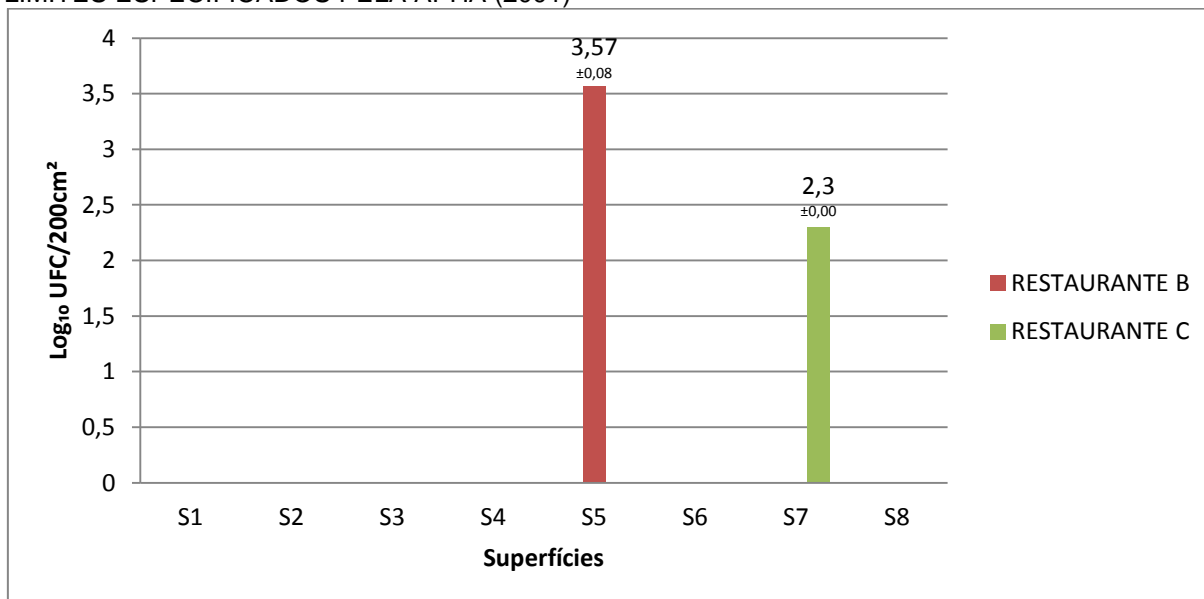
Estudo semelhante foi desenvolvido por Marzano e Balzaretto (2011). Em pesquisa realizada na Itália, os autores avaliaram a qualidade da higiene de 280 superfícies de contato em três serviços de alimentação, e constataram 7,9% das superfícies analisadas em não conformidade às especificações de referência para coliformes Totais. No entanto, não realizaram a identificação bioquímica dos micro-organismos encontrados.

#### 4.1.2 *Staphylococcus* sp

Em relação à contagem de *Staphylococcus* sp, 8,3% (n=2) das superfícies dos restaurantes universitários apresentaram resultados insatisfatórios de acordo com os limites estabelecidos pela APHA (2001). O restaurante “A” apresentou resultado satisfatório para todas as superfícies neste critério. Os restaurantes “B” e “C” apresentaram a mesma frequência de resultados insatisfatórios (12,5% / n=1) em comparação às especificações. As superfícies que apresentaram contagens acima das especificações foram o picador manual de frutas e vegetais no restaurante “B” (3,57 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup>) e o processador de vegetais do restaurante “C” (2,30 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup>) (GRÁFICO 2), o que pode representar um risco, pois nestes equipamentos podem ser processados alimentos que não serão submetidos a tratamento térmico posterior.



GRÁFICO 2 – CONTAGEM DE *Staphylococcus* sp DAS SUPERFÍCIES DOS RESTAURANTES UNIVERSITÁRIOS, CUJOS RESULTADOS SE APRESENTARAM INSATISFATÓRIOS AOS LIMITES ESPECIFICADOS PELA APHA (2001)



UFC: Unidade Formadora de Colônia

S1: Cuba de lavagem e enxágue de frutas e vegetais clorados; S2: Bancadas para processamento de frutas e vegetais; S3: Tábuas de corte para processamento de frutas e vegetais; S4: Caixas plásticas de armazenamento de frutas e vegetais higienizados e processados; S5: Picador manual de frutas e vegetais; S6: Cubas de servimento de frutas e vegetais prontos para consumo; S7: Processador de vegetais; S8: Bandejas de inox com divisórias utilizadas pelos comensais

Silva Jr. (2005) considera como satisfatório a ausência de *Staphylococcus* coagulase positivo em equipamentos e superfícies de preparação de alimentos. Desta forma, a cuba de servimento de frutas e vegetais do restaurante “C”, que apresentou contagem de 2,00 log<sub>10</sub> UFC/cm<sup>2</sup>, também seria considerado inadequado em relação à esta especificação. Já Marzano e Balzaretto (2011) consideram uma contagem adequada de *Staphylococcus* coagulase positivo de até 3,3 log<sub>10</sub> UFC/200cm<sup>2</sup> o que indicaria inadequação apenas do picador manual de frutas e vegetais do restaurante “B”.

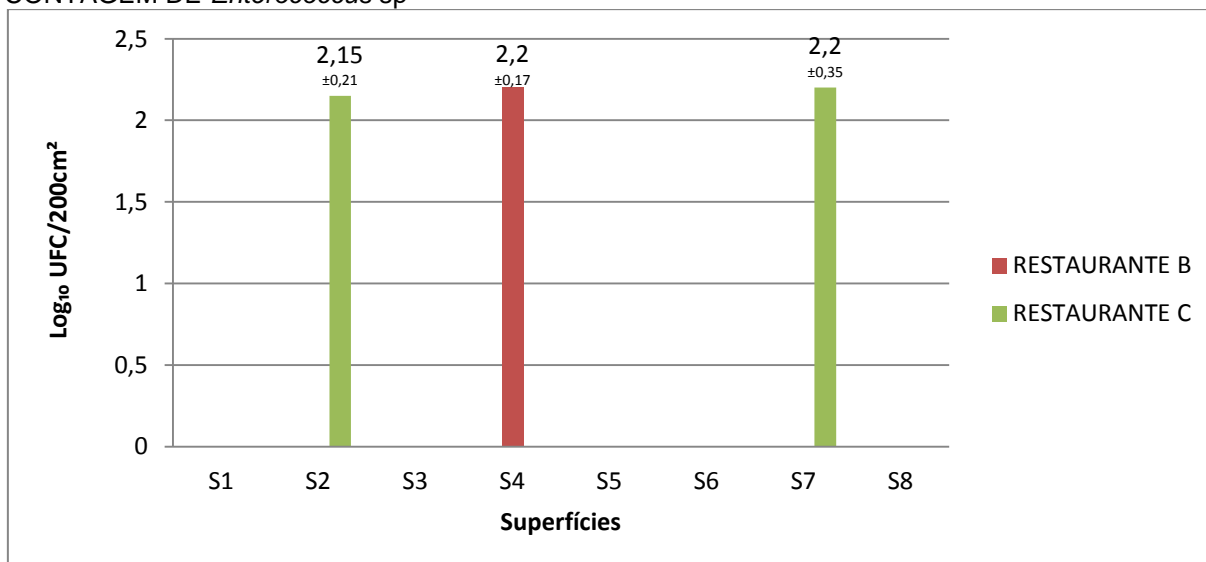
A presença de *Staphylococcus* sp é considerada um indicador de risco da presença de *Staphylococcus* coagulase positivo, o qual pode ser transferido para o alimento que, se exposto a temperaturas e tempo inadequados, poderá propiciar condições favoráveis à multiplicação deste micro-organismo e, por consequência, a produção de sua enterotoxina, aumentando o risco de DTA. Desta forma, torna-se fundamental o controle do processo de higienização das superfícies que entraram em contato com alimentos.

#### 4.1.3 *Enterococcus* sp e *Pseudomonas aeruginosa*

Todas as superfícies dos restaurantes universitários apresentaram resultados satisfatórios em relação às especificações da APHA (2001) para *Enterococcus*. Foram encontradas contagens de *Enterococcus* sp abaixo das especificações da APHA (2001) na superfície da caixa plástica de armazenamento de frutas e vegetais higienizados e processados no restaurante “B” ( $2,20 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup>), na bancada para processamento de frutas e vegetais ( $2,15 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup>) e no processador de vegetais ( $2,20 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup>) do restaurante “C” (GRÁFICO 3). Ao comparar os resultados de *Enterococcus* sp com os resultados de coliformes totais e *E. coli* apresentados no GRÁFICO 1 observa-se que o processo de higienização das superfícies apresentadas no GRÁFICO 3 foi suficiente para eliminação de coliformes totais e *E. coli* mas não para *Enterococcus* sp evidenciando sua maior resistência a processos de desinfecção ambiental.

Foram encontradas contagens de *Pseudomonas aeruginosa*  $<2 \log_{10}$  UFC/200cm<sup>2</sup> em todas as superfícies de todos os restaurantes, caracterizando procedimentos de higiene adequados.

GRÁFICO 3 – SUPERFÍCIES DOS RESTAURANTES UNIVERSITÁRIOS QUE APRESENTARAM CONTAGEM DE *Enterococcus* sp



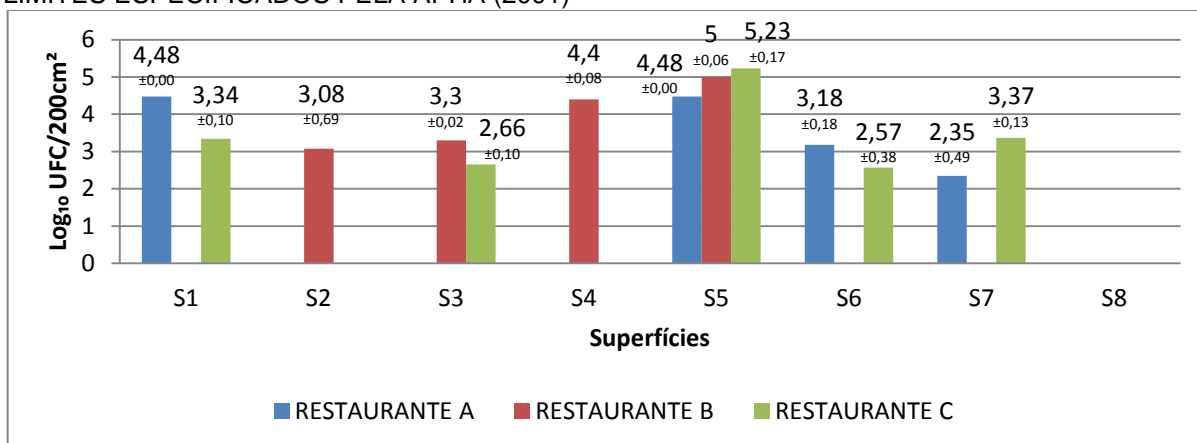
UFC: Unidade Formadora de Colônia

S1: Cuba de lavagem e enxágue de frutas e vegetais clorados; S2: Bancadas para processamento de frutas e vegetais; S3: Tábuas de corte para processamento de frutas e vegetais; S4: Caixas plásticas de armazenamento de frutas e vegetais higienizados e processados; S5: Picador manual de frutas e vegetais; S6: Cubas de servimento de frutas e vegetais prontos para consumo; S7: Processador de vegetais; S8: Bandejas de inox com divisórias utilizadas pelos comensais

#### 4.1.4 Contagem Total de Bactérias

Valores de contagem total de bactérias acima das especificações da APHA (2001) foram encontrados nas superfícies dos três restaurantes universitários. No total, 13 (54,2%) superfícies apresentaram resultados insatisfatórios aos limites estabelecidos. As médias dos valores das amostras que apresentaram contagem positiva para a contagem total de bactérias são apresentadas no GRÁFICO 4. Ao avaliar superfícies de contato de alimentos de hotéis na Espanha, Doménech-Sánchez *et al.*, (2011) relataram que 26% das superfícies apresentaram contagens acima da recomendação de referência para contagem total de bactérias nos utensílios de cozinha, processador de alimentos, bancadas de processamento e tábuas de corte avaliados.

GRÁFICO 4 – CONTAGEM TOTAL DE BACTÉRIAS DAS SUPERFÍCIES DOS RESTAURANTES UNIVERSITÁRIOS, CUJOS RESULTADOS SE APRESENTARAM INSATISFATÓRIOS AOS LIMITES ESPECIFICADOS PELA APHA (2001)



UFC: Unidade Formadora de Colônia

S1: Cuba de lavagem e enxágue de frutas e vegetais clorados; S2: Bancadas para processamento de frutas e vegetais; S3: Tábuas de corte para processamento de frutas e vegetais; S4: Caixas plásticas de armazenamento de frutas e vegetais higienizados e processados; S5: Picador manual de frutas e vegetais; S6: Cubas de servimento de frutas e vegetais prontos para consumo; S7: Processador de vegetais; S8: Bandejas de inox com divisórias utilizadas pelos comensais

Contagens acima das especificações de referência (2,3 log<sub>10</sub> UFC/200cm² - APHA, 2001) indicam um processo de limpeza e desinfecção deficiente. O restaurante “A” e “B” apresentaram quatro (n=4 / 50%) superfícies inadequadas, enquanto o restaurante “C” apresentou cinco (n=5 / 62,5%). Não foi encontrada relação entre os restaurantes para esta categoria pelo teste Exato de Fisher.

O picador manual de frutas e vegetais foi o equipamento que apresentou os maiores valores de contagem total de bactérias nos três restaurantes avaliados (A: 4,48 log<sub>10</sub> UFC/200cm²; B: 5 log<sub>10</sub> UFC/200cm²; C: 5,23 log<sub>10</sub> UFC/200cm²). Estes

resultados sugerem que o procedimento de higiene deste equipamento requer maior atenção. O desenho anti-higiênico deste equipamento, com áreas de difícil limpeza, e a complexa remoção das peças para o processo de higienização podem permitir a sobrevivência e o crescimento de micro-organismos (NEAL, 2013), o que pode ter colaborado para as contagens elevadas encontradas. Contagens elevadas neste equipamento têm sido demonstradas em outros estudos. Garayoa *et al.* (2011), ao avaliarem equipamentos de 20 serviços de alimentação, constataram inadequação do picador manual de frutas e vegetais em relação a contagem total de bactérias em 50% das cozinhas avaliadas.

Coelho *et al.* (2010), avaliaram as superfícies de equipamentos e utensílios em três restaurantes *self-service* da cidade de Viçosa – MG. O picador manual de frutas e vegetais, apresentou contagens entre  $3 \log_{10}$  e  $8 \log_{10}$  UFC/equipamento para micro-organismos mesófilos aeróbios. Tábuas de corte, cubas de inox e bancadas de pré-preparo de vegetais também foram avaliadas evidenciando valores entre  $2 \log_{10}$  -  $9 \log_{10}$  UFC/equipamento;  $2 \log_{10}$  -  $7 \log_{10}$  UFC/equipamento;  $1 \log_{10}$  -  $6 \log_{10}$  UFC/cm<sup>2</sup> respectivamente, demonstrando resultados semelhantes do presente estudo. Oliveira *et al.* (2014) ao realizarem a contagem de bactérias mesófilas em superfícies de contato com alimentos de 117 escolas públicas de Porto Alegre – RS constataram que 41,8% das bancadas e 38,5% das tábuas de corte apresentaram contagem acima do limite considerado satisfatório pela referência.

Marzano e Balzaretto (2013) ao avaliarem as superfícies de contato com alimentos em serviços de alimentação de creches e escolas da Itália verificaram 1,4% das superfícies com valores insatisfatórios para contagem total de bactérias, 0,7% para *Staphylococcus* coagulase positivo e 1,4% para enterobactérias. Estes resultados são inferiores aos valores encontrados neste estudo em relação aos parâmetros de contagem total de bactérias e *Staphylococcus* sp.

As contagens apresentadas neste estudo, principalmente a contagem total de bactérias, indicam procedimento de limpeza não padronizado nos restaurantes universitários, o que pode permitir a presença de micro-organismos patogênicos nas superfícies avaliadas. Outros fatores podem ter colaborado para as diferenças encontradas entre os restaurantes, como tipo de produto de limpeza utilizado, utilização de água quente e tempo de contato dos sanitizantes.

## 4.2 MANIPULADORES DE ALIMENTOS

Na TABELA 2 pode ser visualizada a média dos resultados das análises das amostras coletadas de mãos dos manipuladores imediatamente após o procedimento de lavagem e antissepsia. Foi observado que os resultados apresentaram valores satisfatórios quando comparados com as especificações de Marzano e Balzaretto (2011) para contagem total de bactérias ( $<2,23 \log_{10}$  UFC/8,5cm<sup>2</sup>) e coliformes totais ( $<1,93 \log_{10}$  UFC/8,5cm<sup>2</sup>), caracterizando que as mãos foram lavadas de forma adequada e que foi realizada antissepsia satisfatória.

TABELA 2 – FREQUÊNCIA DE INADEQUAÇÕES NA LAVAGEM E ANTISSEPSIA DAS MÃOS DOS MANIPULADORES EM RELAÇÃO ÀS ESPECIFICAÇÕES DE MARZANO E BALZARETTI (2011)

R*	Contagem Total de Bactérias				Coliformes Totais				Staphylococcus sp			
	(n) %	M	DP	Mín-Max	(n) %	M	DP	Mín-Max	(n) %	M	DP	Mín-Max
A	(0) 0	1,20 <sup>a</sup>	0,69	<0,3 – 2,14	(0) 0	0,09	0,19	<0,3 – 0,77	(3) 11	1,14 <sup>a</sup>	0,66	<0,3 – 2,23
B	(0) 0	1,15 <sup>ab</sup>	0,51	<0,3 – 2,20	(0) 0	-	-	-	(1) 4	1,03 <sup>ab</sup>	0,51	<0,3 – 2,06
C	(0) 0	0,81 <sup>b</sup>	0,48	<0,3 – 1,83	(0) 0	-	-	-	(0) 0	0,70 <sup>b</sup>	0,54	<0,3 – 1,90
TOTAL	(0) 0				(0) 0				(4) 5			

n: número de amostras M: Média; DP: Desvio Padrão

\*RESTAURANTES

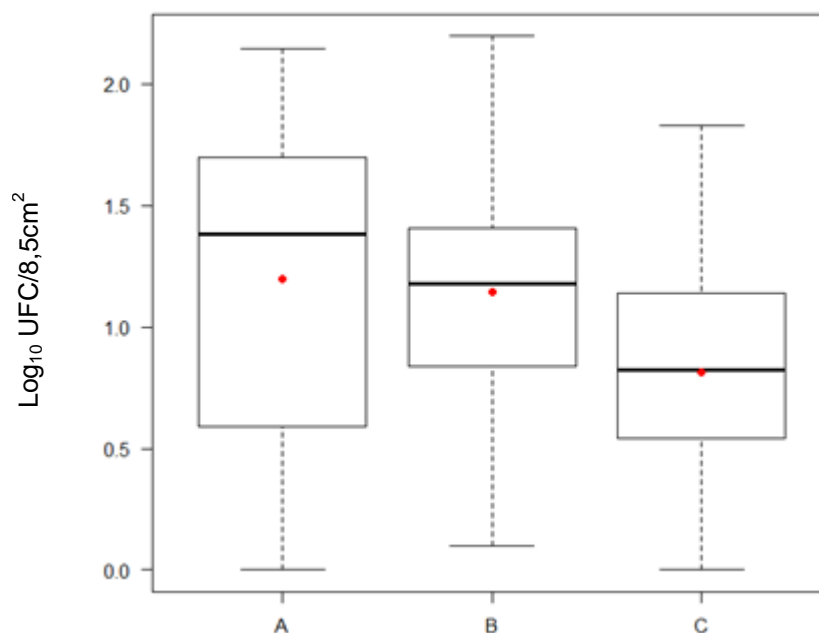
n = 81 (27 por restaurante)

Médias com letras diferentes indicam diferença estatística pela análise da variância (ANOVA) com *post-hoc* de Tukey ( $p < 0,05$ )

### 4.2.1 Contagem Total de Bactérias

Mesmo com resultados satisfatórios em relação às especificações, verifica-se no GRÁFICO 5 a variação entre os valores médios e a variabilidade dos resultados da contagem total de bactérias do restaurante “A” em relação aos restaurantes “B” e “C”. Esse resultado pode caracterizar uma lavagem e antissepsia irregular das mãos dos manipuladores desse restaurante, ou seja, os manipuladores não seguem um padrão de lavagem e antissepsia das mãos. A análise da variância (ANOVA) com *post-hoc* de Tukey ( $p < 0,05$ ) mostrou diferença estatística somente entre os restaurantes “A” e “C” em relação à média da contagem total de bactérias encontradas nas mãos dos manipuladores (TABELA 2).

GRÁFICO 5 - BOXPLOT DA MÉDIA DOS VALORES DA CONTAGEM TOTAL DE BACTÉRIAS DOS MANIPULADORES DE ALIMENTOS NOS RESTAURANTES UNIVERSITÁRIOS AVALIADOS



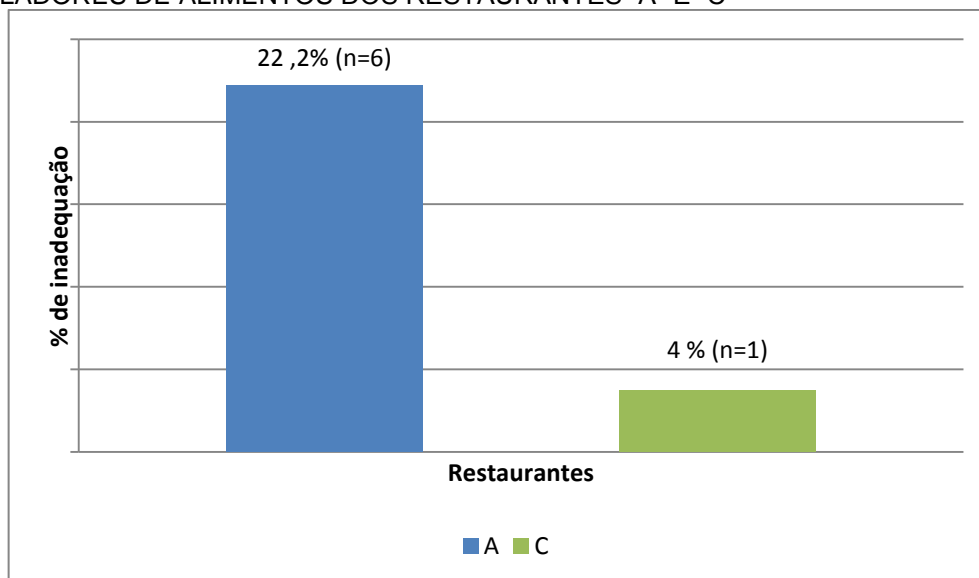
UFC = Unidade Formadora de Colônia

#### 4.2.2 Coliformes Totais

Observou-se que os três restaurantes apresentaram resultados satisfatórios às especificações de Marzano e Balzaretto (2011) para Coliformes totais ( $<1,93 \log_{10}$  UFC/8,5cm<sup>2</sup>). Não foi possível realizar a comparação entre os restaurantes para o critério Coliformes totais devido ao número e amostras com resultado  $<0,3 \log_{10}$  UFC/8,5cm<sup>2</sup>.

Silva Jr. (2005) considera um resultado satisfatório a ausência de coliformes termotolerantes. O grupo dos coliformes termotolerantes, comumente chamados de coliformes fecais, é um subgrupo dos coliformes totais (SILVA *et al.*, 2010). Por serem bactérias transitórias facilmente removidas pelos processos higiênicos, considera-se que não é correto os manipuladores de alimentos apresentarem estes micro-organismos após a lavagem e antissepsia das mãos. Desta forma, é possível estender este limite para coliformes totais considerando que estes, por serem micro-organismos transitórios, também devem estar ausentes nas mãos dos manipuladores após a correta higienização. De acordo com os limites estabelecidos por Silva Jr. (2005) para Coliformes termotolerantes, seis manipuladores do Restaurante “A” (n=6 / 22,2%) e apenas um manipulador do restaurante “C” (n=1 / 3,7%) apresentaram contagens acima do adequado como observado no GRÁFICO 6. Já o restaurante “B” apresentou conformidade com estas especificações.

GRÁFICO 6 – FREQUÊNCIA DE INADEQUAÇÃO EM RELAÇÃO ÀS ESPECIFICAÇÕES DE SILVA JR. (2005)\* PARA COLIFORMES TERMOTOLERANTES DAS MÃOS HIGIENIZADAS DOS MANIPULADORES DE ALIMENTOS DOS RESTAURANTES “A” E “C”



\* Silva Jr., 2005, considera um resultado satisfatório a ausência de coliformes termotolerantes.

Após os testes bioquímicos foram identificados alguns coliformes que apresentam pouca relação com DTA: *Citrobacter freundii*; *Providencia stuartii*: encontradas com frequência na urina; *Enterobacter aerogenes*; *Enterobacter cloacae*: fazem parte da microbiota entérica; *Hafnia alvei*: importância clínica não bem definida, isolada de fezes humanas com ausência de sintomas; *Klebsiella oxytoca*; *Klebsiella pneumoniae*: relacionadas a doenças do trato respiratório; *Leclercia adecarboxylata*: importância clínica incerta; *Yersinia frederiksenii*: encontradas na água doce, solo e alimentos (WINN Jr., et al., 2010). A presença destes micro-organismos caracteriza uma lavagem e antissepsia das mãos pouco efetiva, o que pode representar um risco da presença de micro-organismos patogênicos e de transmissão de doenças através dos alimentos. Não foi identificado *E. coli* em nenhum dos manipuladores de alimentos.

Também foram identificados alguns bacilos Gram-negativos não fermentadores nas mãos de alguns manipuladores como *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* (relacionada com infecções hospitalares); *Burkholderia pseudomallei* (micro-organismo saprófito do solo e água, agente causador de infecção) e *Pseudomonas* spp (agente patógeno oportunista e deteriorante dos alimentos) (PELEG, SEIFERT E PATERSON, 2008; CDC, 2013c).

Soares et al. (2013) avaliaram a contaminação de mãos de manipuladores de alimentos antes e após realizarem a lavagem e antissepsia das mãos e observaram

redução significativa ( $p < 0,01$ ) na contagem de coliformes totais, o que demonstra que uma lavagem efetiva das mãos pode reduzir a microbiota transitória.

Marzano e Balzaretto (2011) demonstraram resultados semelhantes a este estudo para contagem total de bactérias e coliformes totais na análise das mãos de manipuladores de serviços de alimentação. Nenhum manipulador apresentou contaminação por coliformes totais e apenas um apresentou contagem total de bactérias acima do limite de adequação, o que sugere que as mãos foram lavadas adequadamente.

#### 4.2.3 *Staphylococcus* sp

A contagem de *Staphylococcus* sp excedeu ao limite satisfatório ( $> 1,93 \log_{10}$  UFC/8,5cm<sup>2</sup>) em apenas três manipuladores do restaurante “A” (n=3 / 11%) e um manipulador do restaurante “B” (n=1 / 4%). No restaurante “C” nenhum manipulador excedeu as especificações utilizadas. Estes resultados demonstram que as mãos foram higienizadas de forma adequada. No total, apenas 5% (n=4) dos manipuladores dos três restaurantes apresentaram resultados insatisfatórios aos limites estabelecidos como referência (MARZANO E BALZARETTI, 2011). Um dos três manipuladores do restaurante “A” (n=1 / 4%) apresentou *Staphylococcus* coagulase positivo. O restaurante “B” apresentou dois manipuladores (n=2 / 7,4%) com *Staphylococcus* coagulase positivo, porém com resultado abaixo da especificação da referência (QUADRO 8).

Como demonstrado por Hatakka *et al.* (2000), através de estudo realizado visando a detecção de *S. aureus* nas mãos e região nasal de manipuladores de *catering* aéreo, os manipuladores de alimentos tem um alto potencial de contribuir com a contaminação dos alimentos. Os autores encontraram 29% de prevalência de *S. aureus* na região nasal e 9% nas mãos das amostras coletadas, e o mesmo tipo de colônia foi encontrado nas mãos e na região nasal.

Ao observar o QUADRO 8, verifica-se que para alguns manipuladores os resultados de *Staphylococcus* sp apresentaram-se com contagem maior em relação a contagem total de bactérias. Sugere-se que isso se deve ao fato da coleta com laminocultivos específicos para cada micro-organismo ter sido realizada em regiões diferentes das mãos (FIGURA 6) que podem apresentar contagens diferentes para estes micro-organismos.



QUADRO 8 – MÉDIA DAS TRIPLICATAS DAS AMOSTRAS DAS MÃOS DOS MANIPULADORES AVALIADOS

	CTB ( $<2,23 \log_{10} \text{UFC}/8,5\text{cm}^2$ )*			CT ( $<1,93 \log_{10} \text{UFC}/8,5\text{cm}^2$ )*			S ( $<1,93 \log_{10} \text{UFC}/8,5\text{cm}^2$ )*		
REST.	A	B	C	A	B	C	A	B	C
MANIP.	UFC $\log_{10}/8,5\text{cm}^2 \pm \text{DP}$								
M1	1,51±0,07	2,20±0,33	0,56±0,07	0,33±0,58	<0,30	<0,30	1,56±0,36	2,06±0,24	0,60±0,52
M2	1,20±0,63	0,46±0,15	0,30±0,30	0,50±0,87	<0,30	<0,30	1,05±0,25	<0,30	<0,30
M3	1,38±0,41	1,69±0,42	1,56±0,11	0,77±0,86	<0,30	<0,30	1,13±0,43	1,60±0,28	1,44±0,22
M4	<0,30	<0,30	<0,30	<0,30	<0,30	<0,30	0,46±0,56	0,36±0,39	<0,30
M5	1,31±0,18	1,55±0,64	0,50±0,46	<0,30	<0,30	<0,30	1,11±0,36	1,08±0,31	0,62±0,41
M6	1,89±0,42	1,19±0,66	0,78±0,45	<0,30	<0,30	<0,30	1,34±0,13	0,94±0,30	0,67±0,91
M7	2,13±0,50	1,18±0,63	0,64±0,57	0,30±0,30	<0,30	<0,30	1,67±0,17	0,99±0,56	<0,30
M8	1,81±0,55	1,90±0,56	1,09±0,20	<0,30	<0,30	<0,30	1,52±0,54	1,72±0,24	1,00±0,33
M9	1,99±0,10	1,35±0,52	<0,30	<0,30	<0,30	<0,30	1,73±0,28	1,02±0,31	<0,30
M10	1,12±0,52	1,21±0,15	1,04±0,12	<0,30	<0,30	<0,30	1,28±0,49	0,91±0,24	0,77±0,12
M11	<0,30	1,47±0,68	1,34±0,27	<0,30	<0,30	<0,30	<0,30	1,25±0,09	1,20±0,18
M12	<0,30	1,79±0,25	0,85±0,33	<0,30	<0,30	<0,30	0,48±0,48	1,76±0,26	1,37±0,10
M13	1,65±0,28	1,30±0,30	0,98±0,27	0,37±0,64	<0,30	<0,30	1,61±0,32	1,47±0,20	0,92±0,56
M14	1,07±0,22	0,90±0,23	0,52±0,24	<0,30	<0,30	<0,30	<0,30	0,95±0,10	0,30±0,30
M15	1,22±0,13	1,23±0,19	0,61±0,69	<0,30	<0,30	<0,30	1,83±0,52	1,37±0,26	<0,30
M16	0,66±0,64	1,14±0,42	1,45±0,25	<0,30	<0,30	<0,30	<0,30	1,03±0,23	1,54±0,31
M17	0,52±0,38	1,17±0,61	0,78±0,44	<0,30	<0,30	<0,30	0,38±0,43	0,62±0,28	0,59±0,11
M18	1,40±0,09	1,15±0,22	0,82±0,04	<0,30	<0,30	<0,30	1,41±0,23	1,27±0,33	0,88±0,52
M19	1,43±0,16	0,53±0,68	1,83±0,12	<0,30	<0,30	<0,30	0,99±0,11	<0,30	1,90±0,28
M20	0,51±0,52	0,30±0,00	1,19±0,20	<0,30	<0,30	<0,30	<0,30	<0,30	0,32±0,28
M21	1,65±0,61	1,30±0,16	1,27±0,41	<0,30	<0,30	<0,30	2,12±0,52	1,08±0,00	0,43±0,23
M22	<0,30	1,06±0,67	0,66±0,10	<0,30	<0,30	<0,30	0,75±0,48	1,19±0,22	<0,30
M23	2,03±0,07	0,57±0,51	1,02±0,28	<0,30	<0,30	<0,30	2,23±0,15**	1,13±0,57	1,21±0,18
M24	1,74±0,26	0,78±0,23	<0,30	<0,30	<0,30	<0,30	1,79±0,21	0,59±0,11	<0,30
M25	2,14±0,18	1,82±0,10	<0,30	<0,30	<0,30	<0,30	1,98±0,24	1,45±0,28**	<0,30
M26	1,49±0,33	1,01±0,30	0,85±0,22	<0,30	<0,30	<0,30	1,53±0,20	0,82±0,71	0,91±0,24
M27	<0,30	0,58±0,51	1,23±0,58	<0,30	<0,30	<0,30	<0,30	0,93±0,08**	1,29±0,40

CTB: Contagem Total de Bactérias; CT: Coliformes Totais; S: *Staphylococcus* sp; UFC: Unidades Formadoras de Colônias; DP: Desvio Padrão

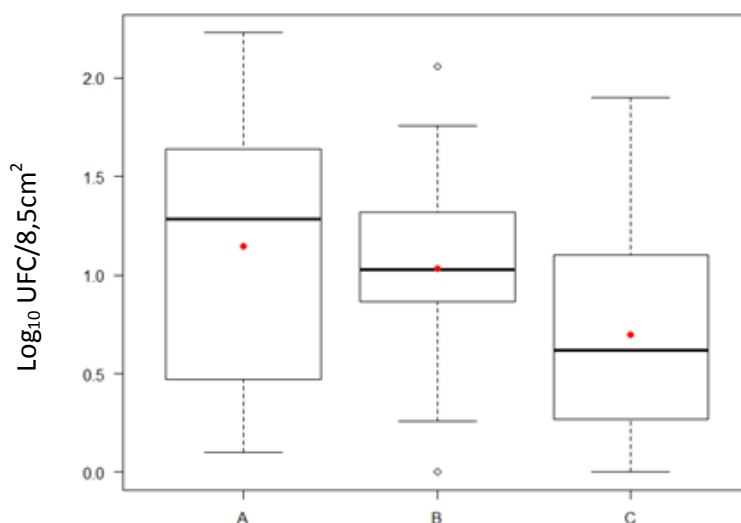
\* Especificações estabelecidas pela referência

\*\* *Staphylococcus* coagulase positivo

Os dados com destaque em amarelo representam as contagens com valores acima do limite satisfatório.

Assim como para contagem total de bactérias, as médias das contagens de *Staphylococcus* sp encontram-se com maior variabilidade no restaurante “A” do que nos demais (GRÁFICO 7). Foi observada diferença estatística na lavagem e antisepsia das mãos dos manipuladores apenas entre os restaurantes “A” e “C”, considerando as médias da contagem de *Staphylococcus* sp (TABELA 2).

GRÁFICO 7 - BOXPLOT DAS MÉDIAS DAS CONTAGENS DE *STAPHYLOCOCCUS* SP DOS MANIPULADORES DE ALIMENTOS NOS RESTAURANTES UNIVERSITÁRIOS AVALIADOS



UFC = Unidade Formadora de Colônia

A presença de *Staphylococcus* sp indica que as mãos dos manipuladores de alimentos não foram lavadas adequadamente e que não foi realizada um antissepsia eficaz. Isto representa um risco da presença de *Staphylococcus* coagulase positivo, ou seja, o fato de não ser detectada a presença de *Staphylococcus* coagulase positivo não exclui a possibilidade de este micro-organismo estar presente na mão dos manipuladores. Contudo, a presença de *Staphylococcus* coagulase positivo só será considerada um perigo se outras práticas de manipulação não forem obedecidas, como o controle de tempo e temperatura no armazenamento, pré-preparo e distribuição dos alimentos manipulados, que, caso permaneçam em condições incorretas de tempo e temperatura, poderão contribuir para a multiplicação do micro-organismo com consequente produção de enterotoxinas nos alimentos (SAEED E HAMID, 2010).

Acco *et al.* (2003), avaliaram a higienização das mãos de 47 manipuladores de uma indústria de alimentos de Porto alegre e isolaram 30% de *S.aureus* nos manipuladores pesquisados. Os resultados da pesquisa realizada por Balzarette e Marzano (2013) com mãos de manipuladores de restaurantes dos aeroportos do norte da Itália mostraram um nível aceitável de higiene nas mãos lavadas. Apenas 3,5% de 287 manipuladores apresentaram contagem acima do satisfatório para *Staphylococcus* coagulase positivos.

O presente estudo sugere que o procedimento de lavagem e antissepsia das mãos foi pouco eficiente devido à presença de micro-organismos transitórios,

mesmo abaixo dos limites estipulados pela referência. A presença destes micro-organismos pode oportunizar a presença e contaminação cruzada aos alimentos manipulados por micro-organismos patogênicos e o risco de transmissão de doenças veiculadas por alimentos.

#### 4.3 ÁGUA FILTRADA E ÁGUA DE TORNEIRA

Os resultados das análises de água filtrada e água de torneira realizadas nos restaurantes universitários são apresentadas na TABELA 3.

TABELA 3 – RESULTADOS DAS ANÁLISES DE ÁGUA FILTRADA E ÁGUA DE TORNEIRA COLETADAS NOS RESTAURANTES UNIVERSITÁRIOS

Coliformes Totais e <i>E. coli</i>			Contagem de Bactérias Heterotróficas à 37°C	
RESTAURANTES	ÁGUA FILTRADA	ÁGUA TORNEIRA	ÁGUA FILTRADA	ÁGUA TORNEIRA
<b>A (n = 2)</b>	Ausência em 100 mL	Ausência em 100 mL	100 UFC/mL	<100 UFC/mL
<b>B (n = 2)</b>	Ausência em 100 mL	Ausência em 100 mL	<100 UFC/mL	<100 UFC/mL
<b>C (n = 2)</b>	Ausência em 100 mL	Ausência em 100 mL	100 UFC/mL	<100 UFC/mL

Verifica-se que todas as amostras de água analisadas estão de acordo com a Portaria nº 2.914 de 12 de dezembro de 2011 do Ministério da Saúde, que estabelece ausência de Coliformes totais e *E.coli* em 100mL de água e de até 500 UFC/mL de bactérias heterotróficas à 37°C. Este resultado sugere que há um tratamento adequado da água, um sistema de distribuição sem falhas e uma limpeza e desinfecção eficaz dos reservatórios de água dos restaurantes, bem como dos bebedouros disponíveis para os consumidores. Os resultados obtidos indicam que há uma frequência regular de troca dos elementos filtrantes dos bebedouros e que os mesmos encontram-se íntegros e limpos.

Marzano e Balzaretto (2011) ao analisarem água da torneira e água filtrada de três estabelecimentos de serviços de alimentação na Itália, verificaram que 3,1 % da água de torneira e nenhuma amostra de água filtrada apresentaram Coliformes totais e *E.coli*. Na contagem de bactérias heterotróficas à 37°C, 21,9% da água de torneira e 46,4% da água filtrada, não estavam de acordo com a legislação local. Em outro estudo realizado pelos mesmos autores em serviços de alimentação de 23 escolas também na Itália, foi encontrado 47,8% de inadequação para HPC à 37°C e

4,3% de inadequação para *E.coli*. A legislação local permite até 20 UFC/mL para HPC e ausência de *E.coli* em 250mL (MARZANO E BALZARETTI, 2013).

Silva *et al.* (2008), ao analisar a qualidade microbiológica da água de torneira na cidade de Maringá - Brasil, verificaram que 3,1% estavam contaminadas com Coliformes totais, e 4,2% encontravam-se acima do limite de adequação da legislação para bactérias heterotróficas. Resultados poucos satisfatórios tendo em vista que a análise foi realizada em água tratada e previamente sanitizada da fonte e, por este motivo, não deveria apresentar Coliformes totais.

O presente estudo sugere que a água filtrada e a água de torneira dos restaurantes universitários são potáveis, ou seja, não apresentam um risco de transmissão de doenças e estão em condições higiênico-sanitárias apropriadas para utilização no processamento de alimentos e para consumo direto por alunos, técnicos e professores. Há um tratamento adequado da água, um sistema de distribuição sem falhas e uma limpeza e desinfecção eficaz dos reservatórios de água.

## 5. CONCLUSÃO

Em relação às superfícies de contato com alimentos, os procedimentos de limpeza e desinfecção apresentaram-se não padronizados nos três restaurantes analisados devido à variabilidade dos resultados encontrados. Para coliformes totais, três do total de 24 superfícies apresentaram resultados insatisfatórios às especificações da APHA (2001) ( $<2,3 \log_{10}$  UFC/200cm<sup>2</sup>), duas superfícies no restaurante “B” e uma no restaurante “C”. O picador manual de frutas e vegetais do restaurante “C” foi a superfície que apresentou a contagem mais elevada para esse critério ( $3,74 \log_{10}$  UFC/200cm<sup>2</sup>). Para *Staphylococcus* sp, 8,3% (n=2) das superfícies apresentaram resultados insatisfatórios, uma superfície do restaurante “B” (picador manual de frutas e vegetais) e uma superfície do restaurante “C” (processador de frutas e vegetais). Todas as superfícies dos três restaurantes apresentaram resultados satisfatórios para *Enterococcus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Para contagem total de bactérias, no total 13 superfícies (54,2%) apresentaram resultados insatisfatórios com as especificações, sendo quatro do restaurante “A”, quatro no restaurante “B” e cinco superfícies do restaurante “C”. Estes resultados sugerem que as superfícies de contato com alimentos dos restaurantes universitários requerem uma melhor prática de limpeza e sanitização.

Os resultados das análises microbiológicas indicam uma boa lavagem e antissepsia das mãos dos manipuladores de alimentos dos restaurantes universitários. Em relação aos critérios coliformes totais ( $<1,93 \log_{10}$  UFC/8,5cm<sup>2</sup>) e Contagem Total de Bactérias ( $<2,23 \log_{10}$  UFC/8,5cm<sup>2</sup>) todos os manipuladores apresentaram resultados satisfatórios às especificações utilizadas. Nenhum manipulador apresentou *E. coli*.

Apenas três manipuladores do restaurante “A” e um do restaurante “B” apresentaram resultados insatisfatórios para *Staphylococcus* sp em relação às especificações de Marzano e Balzaretto (2011) ( $>1,93 \log_{10}$  UFC/8,5cm<sup>2</sup>). Dos três manipuladores do restaurante “A”, em um foi comprovada a presença de *Staphylococcus* coagulase positivo.

A água filtrada e a água de torneira dos restaurantes universitários são potáveis, ou seja, não apresentam um risco de transmissão de doenças e estão em condições higiênico-sanitárias apropriadas para utilização no processamento de alimentos e para consumo direto por usuários dos restaurantes universitários. Há um

tratamento adequado da água, um sistema de distribuição sem falhas e uma limpeza e desinfecção eficaz dos reservatórios de água.

Os resultados sugerem que é necessário um maior esforço para aplicação de procedimentos de higienização nas superfícies de contato com alimentos, principalmente nos restaurantes “B” e “C”. É necessário definir melhores medidas de controle em relação à lavagem das mãos dos manipuladores. A correção destes procedimentos poderá contribuir para o fornecimento de refeições mais seguras aos estudantes, técnicos e professores da UFPR. Nesse sentido, ao assegurar um abastecimento alimentar e de água com qualidade sanitária, os restaurantes universitários estão contribuindo com a política de segurança alimentar e nutricional no ambiente da Universidade.

## REFERÊNCIAS

ABD-ELALEEM, R., BAKR, W. M. K., HAZZAH, W. A., NASRELDIN, O. Assessment of the personal hygiene and the bacteriological quality of butchers' hands in some abattoirs in Alexandria, Egypt. **Food Control**, v. 41, p. 147-150, 2014.

ABDUL-MUTALIB, N., ABDUL-RASHID, M., MUSTAFA, S., AMIN-NORDIN, S., HAMAT, R. A., OSMAN, M. Knowledge, attitude and practices regarding food hygiene and sanitation of food handlers in Kuala Pilah, Malaysia. **Food Control**, v. 27, p. 289-293, 2012.

ABRANDH. AÇÃO BRASILEIRA PELA NUTRIÇÃO E DIREITOS HUMANOS. **Segurança Alimentar e Nutricional – Direito Humano à Alimentação**. Diretrizes voluntárias para o direito à alimentação adequada – Versão resumida. Brasília, 2005.

ACADEMY OF NUTRITION AND DIETETICS. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Nutrition Security in Developing Nations: Sustainable Food, Water, and Health. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**. v. 113, n. 4, p. 581-595, 2013.

ACCO, M., FERREIRA, F.S., HENRIQUES, J.A.P., TONDO, E.C. Identification of multiple strains of *Staphylococcus aureus* colonizing nasal mucosa and food handlers. **Food Microbiology**, n. 20, p. 489-493, 2003.

ALLEN, M. J., EDBERGB, S. C., REASONERC, D. J. Heterotrophic plate count bacteria—what is their significance in drinking water? **International Journal of Food Microbiology**, n. 92, p. 265– 274, 2004.

ANDRADE, N.J. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela, 2008. p. 412

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4<sup>th</sup> ed. Washington, 2001.

APHA. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 22<sup>rd</sup> ed. Washington, 2012.

BALZARETTI, C. M., MARZANO, M. A. Prevention of travel-related foodborne diseases: Microbiological risk assessment of food handlers and ready-to-eat foods in northern Italy airport restaurants. **Food Control**, n. 29, p. 202-207, 2013.

BARTRAM, J., COTRUVO, J., EXNER, M., FRICKER, C., GLASMACHER, A. Heterotrophic plate count measurement in drinking water safety management. Report of an Expert Meeting Geneva, 24–25 April 2002. **International Journal of Food Microbiology**, n. 92, p. 241– 247, 2004.

BARTRAM, J., COTRUVO, J., EXNER, M., FRICKER, C., GLASMACHER, A. Heterotrophic Plate Counts and Drinking-water Safety. World Health Organization (WHO). **International Water Association**, UK. 2003.

BOLTON, D. J., MAUNSELL, B. **Guidelines for Food Safety Control in European Restaurants**. The National Food Centre. 2004.

BOWER, C. K., MCGUIRE, J., DAESCHEL, M. A. The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. Review. **Trends in Food Science & Technology**. v.7, p. 152-157, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. Portaria nº 2.914 de 12 de dezembro de 2011. **Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade**. Ministério da Saúde. Brasília, DF, 2011a. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914\\_12\\_12\\_2011.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html). Acesso em: 06/11/2012

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Sistema nacional de vigilância em saúde: relatório de situação: Paraná**. 5.ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2011b.

BRASIL. Portaria nº104 de 25 de janeiro de 2011. **Define as terminologias adotadas em legislação nacional, conforme o disposto no Regulamento Sanitário Internacional 2005 (RSI 2005), a relação de doenças, agravos e eventos em saúde pública de notificação compulsória em todo o território nacional e estabelece fluxo, critérios, responsabilidades e atribuições aos profissionais e serviços de saúde**. Ministério da Saúde. Brasília, DF, 2011c.



Disponível em:

[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt0104\\_25\\_01\\_2011.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt0104_25_01_2011.html).

Acessado em: 29 de outubro de 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Dados epidemiológicos – DTA – período de 2000 a 2011**. Unidade Técnica de Doenças de Veiculação Hídrica e Alimentar – UHA / Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis – CGDT / Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS. 2011d.

Disponível em:

[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados\\_dta\\_periodo\\_2000\\_2011\\_site.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados_dta_periodo_2000_2011_site.pdf)

. Acesso em 05/11/2012

BRASIL. Portaria nº1428 de 26 de novembro de 1993. **Aprova o "Regulamento Técnico para Inspeção Sanitária de Alimentos", as "Diretrizes para o Estabelecimento de Boas Práticas de Produção e de Prestação de Serviços na Área de Alimentos" e o "Regulamento Técnico para o Estabelecimento de Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ's) para Serviços e Produtos na Área de Alimentos"**. Determina que os estabelecimentos relacionados à área de alimentos adotem, sob responsabilidade técnica, as suas próprias Boas Práticas de Produção e/ou Prestação de Serviços, seus Programas de Qualidade, e atendam aos PIQ's para Produtos e Serviços na Área de Alimentos. Ministério da Saúde. Brasília, DF, 1993.

BRASIL. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº326, de 30 de julho de 1997. **Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Indústrias de Alimentos**. Ministério da Saúde. Brasília, DF, 1997.

BRASIL. Resolução nº275 de 21 de outubro de 2002. **Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos**. Ministério da Saúde. Brasília, DF, 2002.

BRASIL. Portaria nº216 de 15 de setembro de 2004. **Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação**. Ministério da Saúde. Brasília, DF, 2004.

BRASIL. Resolução nº50 de 26 de setembro de 2012. **Dispõe sobre a sistemática de funcionamento da modalidade de execução Compra Institucional, no âmbito do Programa de Aquisição de Alimentos da Agricultura Familiar - PAA**. Grupo Gestor do Programa de Aquisição de Alimentos – GGPA. Secretaria Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional. Ministério do Desenvolvimento Social e Combate à Fome. Brasília, DF, 2012.

BRASIL. **Produtos da agricultura familiar irão abastecer presídios e restaurantes universitários.** Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2012/10/agricultura-familiar-abastece-restaurantes-universitarios>. Acesso em 15 de janeiro de 2013.

BUCKALEW, D.W., HARTMAN, L.J., GRIMSLEY, G.A., MARTIN, A.E., REGISTER, K.M. A long-term study comparing membrane filtration with Colilert® defined substrates in detecting fecal coliforms and *Escherichia coli* in natural waters. **Journal of Environmental Management**, n. 80, p. 191–197, 2006.

BURITY, V., FRANCESCHINI, T., VALENTE, F., RECINE, E., LEÃO, M., CARVALHO, M. F. **Direito humano à alimentação adequada no contexto da segurança alimentar e nutricional.** Brasília, DF: ABRANDH, 2010.

CAPUNZO, M., CAVALLO, P., BOCCIA, G., BRUNETTI, L., BUONOMO, R., MAZZA, G. Food hygiene in Merchant ships: the importance of food handlers' training. **Food Control**, n. 16, p. 183–188, 2005.

CARRASCOSA, C., SAAVEDRA, P., MILLÁN, R., JABER, J. R., PÉREZ, E., GRAU, R., RAPOSO, A., MAURÍCIO, C., SANJUÁN, E.. Monitoring of cleanliness and disinfection in dairies: Comparison of traditional microbiological and ATP bioluminescence methods. **Food Control**, n. 28, p. 368-373, 2012.

CATURLA M.R., VALERO, A., CARRASCO, E., POSADA, G. D., GARCÍA-GIMENO, R. M., ZURERA, G. Evaluation of hygiene practices and microbiological status of ready-to-eat vegetable salads in Spanish school canteens. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n.92, p. 2332–2340, 2012.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Morbidity and Mortality Weekly Report. Vol. 62, nº15. Abril de 2013a. Acessado em: 13 de setembro de 2013. Disponível em: [http://www.cdc.gov/mmwr/mmwr\\_wk/wk\\_cvol.html](http://www.cdc.gov/mmwr/mmwr_wk/wk_cvol.html)

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Morbidity and Mortality Weekly Report. Vol. 62, nº50. Dezembro de 2013b. Acessado em: 09 de abril de 2014. Disponível em: [http://www.cdc.gov/mmwr/mmwr\\_wk/wk\\_cvol.html](http://www.cdc.gov/mmwr/mmwr_wk/wk_cvol.html).

Center for Disease Control and Prevention (CDC). Melioidosis. Disponível em: <http://www.cdc.gov/melioidosis/>. Acessado em: 07 de Novembro de 2013c

CHOWDHURY, S. Heterotrophic bacteria in drinking water distribution system: a review. **Environmental Monitoring and Assessment**, n. 184, p. 6087–6137, 2012.

CLAYTON, D. A., GRIFFITH, C. J., PRICE, P., PETERS, A. C. Food handlers' beliefs and self-reported practices. **International Journal of Environmental Health Research**. n. 12, p. 25– 39, 2002.

COELHO, A. I. M.; MILAGRES, R. C. R. M.; MARTINS, J. F. L.; AZEREDO, R. M. C.; SANTANA, A. M. C. **Contaminação microbiológica de ambientes e de superfícies em restaurantes comerciais**. *Ciência & Saúde Coletiva*, n. 15, Supl. 1, p. 1597-1606, 2010.

COELHO, D. L., PIMENTEL, I. C., BEUX, M. R. Uso do método do substrato cromogênico para quantificação do número mais provável de bactérias do grupo coliforme em águas minerais envasadas. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 16, n. 1, p. 45-54, 1998.

CONSEA – CONSELHO NACIONAL DE SEGURANÇA ALIMENTAR. Ministério da Saúde. **II Conferência Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional. Relatório final**. Olinda, Pernambuco. 2004

COSBY, C. M., COSTELLO, C. A., MORRIS, W. C., HAUGHTON, B., DEVEREAUX, M. J., HARTE, F., DAVIDSON, P. M. Microbiological Analysis of Food Contact Surfaces in Child Care Centers . **Applied and Environmental Microbiology**. v.74, n.28, p. 6918–6922, 2008.

COSTERTON, J. W., LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL, D. E., KORBER, D. R., LAPPIN-SCOTT, H. M. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**. n. 49, p. 711-45, 1995.

CRAIG, W. A., KUNIN C. M. Quantitative urine culture method using a plastic “paddle” containing dual media. **Applied microbiology**. v.23, n.5, 1972.

CUNHA, D. T., OLIVEIRA, A. B. A., SACCOL, A. L. F., TONDO, E. C., JUNIOR, E. A. S., GINANI, V. C., MONTESANO, F. T., CASTRO, A. K. F., STEDEFELDT, E. Food safety of food services within the destinations of the 2014 FIFA World Cup in Brazil: Development and reliability assessment of the official evaluation instrument. **Food Control**, n. 57, p.95-103, 2014.

DOMÉNECH-SÁNCHEZ, A., LASO, E., PÉREZ, M.J., BERROCAL, C. I. Microbiological levels of randomly selected food contact surfaces in hotels located in Spain during 2007-2009. **Foodborne Pathogens and Disease**. v.8 n.9, p. 1025-1029, 2011.

DUBUGRAS, M. T. B.; PÉREZ-GUTIÉRREZ, E. **Perspectiva sobre a análise de risco na segurança dos alimentos. Curso de sensibilização.** Rio de Janeiro: Área de Vigilância Sanitária, Prevenção e Controle de Doenças - OPAS/OMS, 2008.

ENVIRONMENT AGENCY. The Microbiology of Drinking Water. Part 1. **Water Quality and Public Health.** Methods for the Examination of Waters and Associated Materials. 2002.

FALCONE-DIAS, M. F., FARACHE FILHO, A. Quantitative variations in heterotrophic plate count and in the presence of indicator microorganisms in bottled mineral water. **Food Control**, n. 31, p. 90-96, 2013.

FIGUERAS, M<sup>a</sup>. J., BORREGO, J. J. New Perspectives in Monitoring Drinking Water Microbial Quality. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, n. 7, p. 4179-4202, 2010.

Food and Drug Administration (FDA) **FDA Report on the Occurrence of Foodborne Illness Risk Factors in Selected Institutional Foodservice, Restaurant, and Retail Food Store Facility Types** (2009a). Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/RetailFoodProtection/FoodborneIllnessRiskFactorReduction/ucm224338.htm>. Acessado em: 28 de outubro de 2013.

Food and Drug Administration (FDA). **Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins**. 2. ed. 2012.

Food and Drug Administration (FDA). **Food Code. Recommendations of the United States Public Health Service Food and Drug Administration** (2013). Disponível em: <http://www.fda.gov/food/guidanceregulation/retailfoodprotection/foodcode/default.htm>. Acessado em: 23 de abril de 2014.

Food and Drug Administration (FDA). **Protecting and Promoting your Health. Food Guidance and Regulation, Retail Food Protection. Food Code: Chapter 5 – Water, Plumbing and Waste** (2009b). Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/RetailFoodProtection/FoodCode/UCM2019396.htm>. Acessado em: 02 de setembro de 2013.

Food and Drug Administration (FDA). **Report of the FDA Retail Food Program Database of Foodborne Illness Risk Factors (2000)**. Disponível em:

<http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/UCM123546.pdf>. Acessado em: 28 de outubro de 2013.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

FRANCISQUE, A., RODRIGUEZ, M. J., MIRANDA-MORENO, L. F., SADIQ, R., PROULX, F. Modeling of heterotrophic bacteria counts in a water distribution system. **Water Research**, n. 43, p. 1075 – 1087, 2009.

FRANCO, B. D. G. de M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2008.

GARAYOA R., VITAS, A. I., DíEZ-LETURIA, M., GARCÍA-JALÓN, I. Food safety and the contract catering companies: Food handlers, facilities and HACCP evaluation. **Food Control** n. 22, p. 2006-2012, 2011.

GERMANO, M. I. S. **Treinamento de Manipuladores de Alimentos: fator de segurança alimentar e promoção da saúde**. São Paulo: Varela, 2003.

GÓMEZ, D., ARIÑO, A., CARRAMIÑANA, J. J., ROTA, C., YANGÜELA, J. Sponge versus mini-roller for the surface microbiological control of *Listeria monocytogenes*, total aerobic mesophiles and *Enterobacteriaceae* in the meat industry. **Food Control** n. 27, p. 242-247, 2012.

GREIG, J. D., TODD, E. C. D., BARTLESON, C. A., MICHAELS, B. S. Outbreaks Where Food Workers Have Been Implicated in the Spread of Foodborne Disease. Part 1. Description of the Problem, Methods, and Agents Involved. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 7, p. 1752–1761, 2007.

GUTTMANN, D., NAYLOR, G. R. E. Dip-Slide: An Aid to Quantitative Urine Culture in General Practice. **British Medical Journal**., n. 3, p. 343-345, 1967.

HATAKKA, M., BJÖRKROTH, K.J., ASPLUD, K., MÄKI-PETÄYS, N., KORKEALA, H. Genotypes and enterotoxicity of *Staphylococcus aureus* isolated from the hands and nasal cavities of flight-catering employees. **Journal of Food Protection**. n. 11, p. 1487–1491, 2000.

HOWEELS, A. B., ROBERTS, K. R., SHANKLIN, C. W., PILLING, V. K., BRANNON, L. A., BARRETT, B. B. Restaurant employees' perceptions of barriers to three food

safety practices. **Journal of the American Dietetic Association**. v. 8, n. 108, 1345-9. 2008.

ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. **A Simplified Guide to Understanding and Using Food Safety Objectives and Performance Objectives**. 2006. Disponível em: <http://www.icmsf.org/pdf/FSO%20Objectives/GuiaSimplificadoEnglish.pdf>. Acessado em: 04 de abril de 2014.

KO, W. Evaluating food safety perceptions and practices for agricultural food handler. **Food Control**. v. 21, p. 450–455, 2010.

KO, W. The relationship among food safety knowledge, attitudes and self-reported HACCP practices in restaurant employees. **Food Control**, n. 29, 192-197, 2013.

KOO, O., MARTIN, E. M., STORY, R., LINDSAY, D., RICKE, S. C., CRANDALL, P. G. Comparison of cleaning fabrics for bacterial removal from food-contact surfaces. **Food Control**, n. 30, p. 292-297, 2013.

KOOIJ, D. van der. **Managing regrowth in drinking-water distribution systems**. Heterotrophic Plate Counts and Drinking-water Safety. Edited by J. Bartram, J. Cotruvo, M. Exner, C. Fricker, A. Glasmacher. World Health Organization (WHO). International Water Association, UK. 2003.

JAY, M. J. **Microbiologia de alimentos**. 6. Ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005.

LABORCLIN. Aquatest Coli – ONPG MUG (2009). Disponível em: <http://www.laborclin.com.br/principal.asp>. Acessado em: 17 de setembro de 2013

LABORCLIN. Aquacult (2010). Disponível em: <http://www.laborclin.com.br/principal.asp>. Acessado em: 17 de setembro de 2013

LABORCLIN. Nutrilab (2012). Disponível em: <http://www.laborclin.com.br/produto.asp?id=500103>. Acessado em: 17 de setembro de 2013

LEÃO, M.; MALUF, R. S. **A construção social de um sistema público de segurança alimentar e nutricional: a experiência brasileira**. Brasília, ABRANDH, 2012. 72 p.

LECHEVALLIER, M. W. **Conditions favouring coliform and HPC bacterial growth in drinking-water and on water contact surfaces.** Heterotrophic Plate Counts and Drinking-water Safety. Edited by J. Bartram, J. Cotruvo, M. Exner, C. Fricker, A. Glasmacher. World Health Organization (WHO). International Water Association, UK. 2003.

LEHTO, M., KUISMA, R., MÄÄTTÄ, J., KYMÄLÄINEN, H., MÄKI, M. Hygienic level and surface contamination in fresh-cut vegetable production plants. **Food Control**, n. 22, p. 469-475, 2011.

LOPES, E.A. **Guia para elaboração dos procedimentos operacionais padronizados exigidos pela RDC nº275 da ANVISA.** São Paulo: Livraria Varela, 2004.

LORRIER, J. C. VALKENBURG, H. A. Quantitative Urine Culture by Surface Drop Method. **Applied Microbiology**, v.18, n.1, p. 57-63, 1969.

LUES, J. F. R., VAN TONDER, I. The occurrence of indicator bacteria on hands and aprons of food handlers in the delicatessen sections of a retail group. **Food Control**, n. 18, p. 326–332, 2007.

MALHEIROS, P. S., PASSOS, C. T., CASARIN, L. S., SERRAGLIO, L., TONDO, E. C. Evaluation of growth and transfer of *Staphylococcus aureus* from poultry meat to surfaces of stainless steel and polyethylene and their disinfection. **Food Control**, n. 21, p. 298–301, 2010.

MARTINS, R. B., HOGG, T., OTERO, J. G. Food handlers' knowledge on food hygiene: The case of a catering company in Portugal. **Food Control**, n. 23, p. 184-190, 2012.

MARZANO, M.A., BALZARETTI, C.M. Cook-serve method in mass catering establishment: Is it still appropriate to ensure a high level of microbiological quality and safety? **Food Control**, n.22, p.1844-1850, 2011.

MARZANO, M.A., BALZARETTI, C.M. Protecting child health by preventing school-related foodborne illnesses: Microbiological risk assessment of hygiene practices, drinking water and ready-to-eat foods in Italian kindergartens and schools. **Food Control**, n. 34, p.560-567, 2013.

MASSAGUER, P. R. **Microbiologia dos processos alimentares.** São Paulo: Livraria Varela, 2005.

MASUKU, S.M., BABU, D., MARTIN, E.M., KOO, O.K., O'BRYAN, C.A., CRANDALL, P.G. RICKE, S.C. Cleaning and decontamination efficacy of wiping cloths and silver dihydrogen citrate on food contact surfaces. **Journal of Applied Microbiology**, n. 113, p. 89–95, 2012.

MCINTYRE, L., VALLASTER, L., WILCOTT, L., HENDERSON, S. B., KOSATSKY, T. Evaluation of food safety knowledge, attitudes and self-reported hand washing practices in FOODSAFE trained and untrained food handlers in British Columbia, Canada. **Food Control**, n. 30, p. 150-156, 2013.

MEIRA, Q. G. S., BARBOSA, I. M., ATHAYDE, A. J. A. A., SIQUEIRA-JÚNIOR J. P., SOUZA E. L. Influence of temperature and surface kind on biofilm formation by *staphylococcus aureus* from food-contact surfaces and sensitivity to sanitizers. **Food Control**, n. 25, p. 469-475, 2012.

MONTAÑEZ-IZQUIERDO, V. Y., SALAS-VÁZQUEZ, D. I., RODRÍGUEZ-JEREZ, J. J. Use of epifluorescence microscopy to assess the effectiveness of phage P100 in controlling *Listeria monocytogenes* biofilms on stainless steel surfaces. **Food Control**, n. 23, p. 470-477, 2012.

MOORE, G., GRIFFITH, C. A comparison of surface sampling methods for detecting coliforms on food contact surfaces. **Food Microbiology**, n. 19, p. 65-73, 2002.

NASOPOULOU, C., POULIOS, P., MAGLI, M., GDONTELIS, N., PAPANOTAS, C., ZABETAKIS, I. Verification of Hazard Analysis and Critical Control Point in hotels and catering units: Evaluation of the cleaning and disinfection procedures and microbiological monitoring of hot and cold meals. **Food and Nutrition Sciences**, n. 3, p. 606-613, 2012.

NEAL, J. A. Comparative analysis of training delivery methods for new employees cleaning and sanitizing retail deli slicers: An exploratory study. **Food Control**, n.29, p.149-155, 2013.

NUNES, M. M., MOTA, A. L. A. A., CALDAS, E. D. Investigation of food and water microbiological conditions and foodborne disease outbreaks in the Federal District, Brazil. **Food Control**, n. 34, p. 235-240, 2013.

OLIVEIRA, A. B. A., CUNHA, D. T. da, STEDEFELDT, E., CAPALONGA, R., TONDO, E. C., CARDOSO, M. R. I. Hygiene and good practices in school meal



services: Organic matter on surfaces, microorganisms and health risks. **Food Control**, n. 40, p. 120-126, 2014.

ORTEGA, A. C.; BORGUES, M. da S. Codex Alimentarius: a segurança alimentar sob a ótica da qualidade. *Segurança Alimentar e Nutricional*, **Campinas**, v. 19, n. 1, p. 71-81, 2012.

OSAILI, T. M., ABU JAMOUS, D. O., OBEIDAT, B. A., BAWADI, H. A., TAYYEM, R. F., SUBIH, H. S.. Food safety knowledge among food workers in restaurants in Jordan. **Food Control**, n. 31, p. 145-150, 2013.

PATTERSON, J. T. Microbiological assessment of surfaces. **Journal of Food Technology**. n.6, 63-72, 1971.

PAYMENT, P.; SARTORY, D. P.; REASONER, D. J. **The history and use of HPC in drinking-water quality management**. Heterotrophic Plate Counts and Drinking-water Safety. Edited by J. Bartram, J. Cotruvo, M. Exner, C. Fricker, A. Glasmacher. World Health Organization (WHO). International Water Association, UK. 2003.

PELEG, A. Y., SEIFERT, H., PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 3, p. 538–582, 2008

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. 2. Ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; PINTO A. F. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. 3. Ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

PITKÄNEN, T., PAAKKARI, P., MIETTINEN, I. T., HEINONEN-TANSKI, H., PAULIN, L., HÄNNINEN, M. Comparison of media for enumeration of coliform bacteria and *Escherichia coli* in non-disinfected water. **Journal of Microbiological Methods**, n. 68, p. 522–529, 2007.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. Version 3.0.2. 2013. Disponível em: <http://www.R-project.org>. Acesso em: Fevereiro, 2014.

ROBERTSON, W., BROOKS, T. **The role of HPC in managing the treatment and distribution of drinking-water.** Heterotrophic Plate Counts and Drinking-water Safety. Edited by J. Bartram, J. Cotruvo, M. Exner, C. Fricker, A. Glasmacher. World Health Organization (WHO). International Water Association, UK. 2003.

ROMPRÉ, A., SERVAIS, P., BAUDART, J., DE-ROUBIN, M., LAURENT, P. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. **Journal of Microbiological Methods**, n. 49, p. 31–54, 2002.

SAEED, H. A., HAMID, H. H. Bacteriological and Parasitological Assessment of Food Handlers in the Omdurman Area of Sudan. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**. v. 1, n. 43, p. 70–73, 2010.

SANT'ANA, A. S., AZEREDO, D. R. P. Comparação entre o sistema petrifilm RSA® e a metodologia convencional para a enumeração de estafilococos coagulase positiva em alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas. v. 25, n.3, p. 531-535, jul.-set, 2005.

SANTOS, S. M. C.; SANTOS, L, M, P. Avaliação de políticas públicas de segurança alimentar e combate à fome no período de 1995-2002 . 1 – Abordagem metodológica. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro. v. 23, n. 5, p. 1029-1040. Maio, 2007.

SÃO JOSÉ, J. F. B. Contaminação microbiológica em serviços de alimentação: importância e controle. **Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr. = J. Brazilian Soc. Food Nutr.**, São Paulo, SP, v. 37, n. 1, p. 78-92, 2012.

SILVA JUNIOR, E. A. **Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Serviços de Alimentação**. 6. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2005.

SILVA, N., JUNQUEIRA, V. C. A; SILVEIRA, N. F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R. F. S. dos; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Varela, 2010.

SILVA, M. Z. da.; E., SANTANA, R. G., GUILHERMETTI, M., FILHO, I. C., ENDO, E. H., UEDA-NAKAMURA T., NAKAMURA, C. V., DIAS FILHO, B. P. Comparison of the bacteriological quality of tap water and bottled mineral water. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**. n. 211, 504–509, 2008.

SNYDER, O. P. Hand washing for retail food operations – A review. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**. v.18, n. 3, p. 149-162,1998.

SOARES, L.S., ALMEIDA, R.C.C., CERQUEIRA, E.S., CARVALHO, J.S., NUNES, I.L. Knowledge, attitudes and practices in food safety and the presence of coagulase-positive *staphylococci* on hands of food handlers in the schools of Camaçari, Brazil. **Food Control**. V. 27, p. 206-213, 2012.

SOARES, K., GARCÍA-DÍEZ, J., ESTEVES, A., OLIVEIRA, I., SARAIVA, C.. Evaluation of food safety training on hygienic conditions in food establishments. **Food Control**, n. 34, 613-618, 2013.

SOLANO, R., LAFUENTE, S., SABATE, S., TORTAJADA, C., OLALLA, P. G., HERNANDO, A. V., CAYLÀ, J. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus*: An outbreak at a Barcelona sports club in July 2011. **Food Control**, n. 33, p. 114-118, 2013.

SORIANO, J. M., FONT, G., MOLTÓ, J. C., MAÑEZ, J. Enterotoxigenic staphylococci and their toxins in restaurants foods. **Trends in Food Science & Technology**, n 13. p. 60-67. 2002.

SREY, S., JAHID, I. K., HÁ, S. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food Control**, n. 31, p. 572-585, 2013.

STANDING COMMITTEE OF ANALYSTS. The Microbiology of Drinking Water - Part 4 - Methods for the isolation and enumeration of coliform bacteria and *Escherichia coli* (including *E. coli* O157:H7) Methods for the Examination of Waters and Associated Materials. **Environment Agency**. 2009

TEBBUTT, G. M. A microbiological study of various food premises with an assessment of cleaning and disinfection practices. **The Journal of Hygiene, Cambridge**, n. 92, p. 365-375, 1984.

TEBBUTT, G.M. Does microbiological testing of foods and the food environment have a role in the control of foodborne disease in England and Wales? **Journal of Applied Microbiology**, n. 102, p. 883–891, 2007.

TODD, E. C. D., GREIG, J. D., BARTLESON, C. A., MICHAELS, B. S. Outbreaks Where Food Workers Have Been Implicated in the Spread of Foodborne Disease. Part 2. Description of Outbreaks by Size, Severity, and Settings. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 8, p. 1975–1993, 2007.

TONDO, E.C.; BARTZ, S. **Microbiologia e sistemas de gestão da segurança de alimentos**. Porto Alegre: Sulina, 2012.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (UFPR). Pró-Reitoria de Administração. **Histórico do Restaurante Universitário da UFPR**. Disponível em: <http://www.pra.ufpr.br/portal/ru/historico/>. Acesso em 15 de janeiro de 2013a

\_\_\_\_\_. Centro de Estudos do Mar (CEM). Informações Do CEM. Disponível em: [http://www.cem.ufpr.br/?page\\_id=67](http://www.cem.ufpr.br/?page_id=67). Acesso em: 06 de junho de 2013b.

\_\_\_\_\_. UFPR Litoral. Histórico. Disponível em: <http://www.litoral.ufpr.br/historico>. Acesso em: 06 de junho de 2013c.

\_\_\_\_\_. UFPR Campus Palotina. Histórico. Disponível em: <http://www.campuspalotina.ufpr.br/?q=node/19>. Acesso em: 06 de junho de 2013d.

WACHOWICZ, R.C. **Universidade do Mate: História da UFPR**. 2.ed. Curitiba: Editora da UFPR, 2006.

WHO. World Health Organization. **Basic Food Safety for Health Workers**. Geneva, 1999. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/general/en/index.html>

WHO. World Health Organization. **Codex General Principles of Food Hygiene**. 2003.

WHO. World Health Organization. **Guidelines for drinking-water quality [electronic resource]: incorporating 1st and 2nd addenda**, Vol.1, Recommendations. – 3<sup>rd</sup> ed. Geneva: 2008.

WINN Jr. W., ALLEN, S., JANDA, W., KONEMAN, E., PROCOP, G., SCHRECKENBERGER, G. W. **Koneman – Diagnóstico Microbiológico**. 6. ed. texto e atlas coloridos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

YÁÑEZ, M. A., VALOR, C., CATALÁN, V. A simple and cost-effective method for the quantification of total coliforms and *Escherichia coli* in potable water. **Journal of Microbiological Methods**, n. 65, 608–611, 2006.



## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, Louise Cristiane Turcatel Iwamura, pesquisadora da Universidade Federal do Paraná, convido (o Senhor, a Senhora, você) manipulador de alimentos a participar de um estudo intitulado “Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de três Restaurantes Universitários da Universidade Federal do Paraná da cidade de Curitiba - PR”. Este trabalho é de fundamental importância, pois a qualidade sanitária dos restaurantes universitários reflete na saúde dos estudantes, servidores e professores da Universidade Federal do Paraná.

O objetivo desta pesquisa é analisar a condição higiênico-sanitária dos restaurantes universitários da UFPR.

a) Caso você participe da pesquisa, será necessário que lave a suas mãos normalmente, como realizado diariamente durante o trabalho no restaurante. Após o processo de lavagem, irei “carimbar” suas mãos com uma placa contendo uma “gelatina”. Esta placa será levada para o laboratório de Higiene de Alimentos do Departamento de Nutrição da Universidade Federal do Paraná, e através dela será avaliada a quantidade de microrganismos que se desenvolvem. Esta avaliação nos mostra em que condições de higiene se encontravam suas mãos no momento em que foram “carimbadas” com a “gelatina”.

b) Para tanto você deverá comparecer normalmente ao seu local de trabalho – restaurante universitário - para coleta do “carimbo” citado acima. Esta coleta será realizada em aproximadamente dois dias.

c) O estudo apresenta o risco que é a possibilidade de você se sentir constrangido com a técnica de coleta. Os microrganismos que serão pesquisados têm a função de avaliar e/ou corrigir procedimentos (como lavagem periódica das mãos) com a finalidade de eliminar as bactérias para que não coloquem em risco os alimentos manipulados.

d) Os benefícios esperados com essa pesquisa são: melhorar as condições higiênico-sanitárias dos restaurantes universitários. No entanto, nem sempre você será diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, mas poderá contribuir para o avanço científico.

e) A pesquisadora Louise Cristiane Turcatel Iwamura, mestranda, nutricionista, responsável por este estudo poderá ser contatada no Prédio de Nutrição da UFPR, Avenida Prefeito Lothário Meissner, 632, de segunda a sexta, das 9h às 17h, pelo telefone: 41 XXXX-XXXX para esclarecer eventuais dúvidas que (o Sr., a Sra. , ou você) possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

f) A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado.

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde/UFPR.

Em, 06/03/2012

Rubricas: Participante da Pesquisa I \_\_\_\_\_

Pesquisador Responsável \_\_\_\_\_

g) As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas como a orientadora e co-orientadora da pesquisa. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a **sua identidade seja preservada e seja mantida a confidencialidade**.

h) As despesas necessárias para a realização da pesquisa não são de sua responsabilidade e pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro. Você terá a garantia de que problemas como: interrupções do trabalho, decorrentes do estudo, serão tratadas com os responsáveis do restaurante universitário.

i) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código. O código não será relacionado ao seu nome, desta forma, sua identidade será preservada, e não será possível identificar o nome que apresentou ou não bactérias nas mãos.

Eu, \_\_\_\_\_ li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

\_\_\_\_\_  
(Assinatura do participante de pesquisa ou responsável legal)

Local e data

Assinatura do Pesquisador

Comitê de ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR

Rua Pe. Camargo, 280 – 2º andar – Alto da Glória – Curitiba-PR – CEP:80060-240

Tel (41)3360-7259 - e-mail: cometica.saude@ufpr.br

Aprovado pelo Comitê de Ética  
em Pesquisa do Setor de Ciências  
da Saúde/UFPR.

Em, 06 / 03 / 2013